

**Molekularbiologische Untersuchungen
zu Persistenz und Typisierung der Herpes simplex Viren
Serotypen 1 und 2**

Heinrich Schulte Holthausen

Aus dem Institut für Klinische Virologie
der Universität Erlangen-Nürnberg
Vorstand: Prof. Dr. H. zur Hausen

**Molekularbiologische Untersuchungen
zu Persistenz und Typisierung der Herpes simplex Viren
Serotypen 1 und 2**

Habilitationsschrift
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Heinrich Schulte Holthausen

Erlangen 1972

Molekularbiologische Untersuchungen
zu Proteinase und Typisierung des Herpes simplex Virus
Serotypen 1 und 2

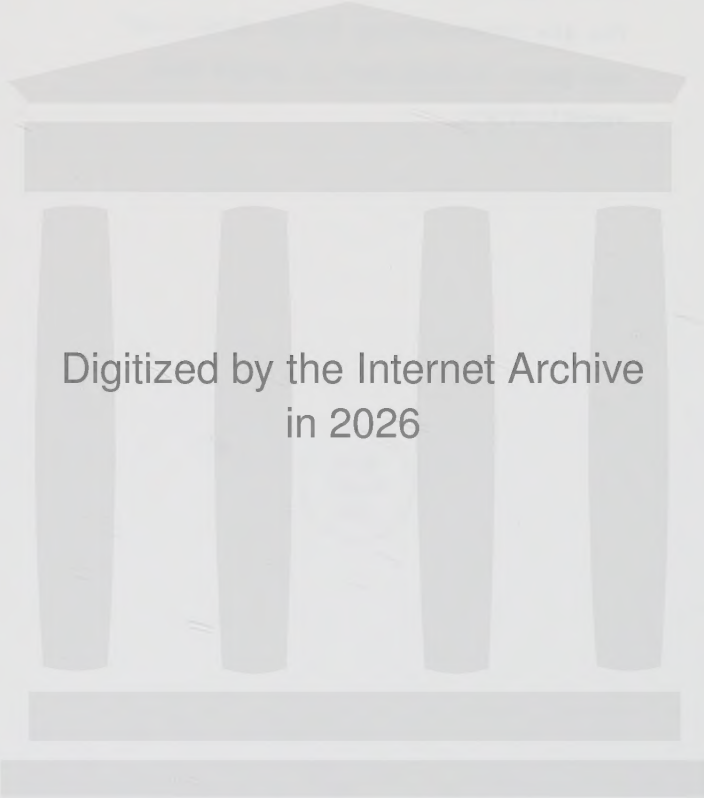
Wissenschaftliche Fakultät
der Medizinischen Hochschule
der Friedrich-Wilhelms-Universität
Münster



Tag der Habilitation: 30. 8. 73

Erlangen 1973

Herrn Professor Dr. H. zur Hausen und
Herrn Professor Dr. E. Wecker bin ich
für die Unterstützung dieser Arbeit und
anregende Diskussionen zu großem Dank
verpflichtet.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis.

I.	Einleitung	1
II.	Materialien	6
III.	Methoden	9
	1. Suspensionskulturen	9
	2. Monolayer-Kulturen	9
	3. Virusvermehrung	9
	4. Ernte nichtinfektiöser Viruspartikel	10
	5. Ernte infektiöser Viruspartikel	10
	6. Plaquetest	11
	7. Isolierung viraler DNS aus Viruspartikeln	11
	8. Extraktion zellulärer DNS	12
	9. Extraktion zellulärer RNS	13
	10. in-vitro-Transkription viraler DNS in komplementäre RNS	14
	11. Säurefällbarkeit der c-RNS	14
	12. Bestimmung der Sedimentations- konstante der c-RNS	15
	13. Bestimmung der RNase-Sensitivität der c-RNS	15
	14. DNS-DNS-Nukleinsäurehybridisie- rung	15
	15. DNS-RNS-Hybridisierung in wässri- ger Lösung	16
	16. DNS-RNS-Hybridisierung in 50 %igem Formamid	17
	17. DNS-RNS-Hybridisierung in situ	17
	18. Autoradiographie der DNS-RNS- Hybride	17
	19. Modifizierte Giemsa-Färbung	18

IV. Ergebnisse

1. Test einiger Zellarten auf HSV-Produktion	19
2. Isolierung viraler DNS	21
3. in-vitro-Transkription viraler DNS in komplementäre RNS	28
4. Differenzierung von Herpes-simplex-Stämmen durch HYbridisierung mit viraler DNS aus den Sero-typen 1 und 2	37
5. Versuche zur Etablierung einer persistierenden HSV-Infektion in menschlichen Zellen	48
6. Infektion menschlicher primärer Zellen mit UV-bestrahltem HSV-2	58
a) Inaktivierungskinetik	58
b) Infektion primärer Leukozyten	59
c) Infektion embryonaler Fibroblasten	60
7. Versuche zum Nachweis von DNS des Herpes simplex Typ. 2 in Biopsien menschlicher Cervix-Karzinome	62

V. Diskussion	73
---------------	----

Zusammenfassung der Ergebnisse	77
--------------------------------	----

Literaturzusammenstellung	79
---------------------------	----

I. Einleitung.

Seit Grüter (30) im Jahre 1924 das Herpes-simplex-Virus vom Menschen auf einen heterologen Wirt, das Kaninchen, übertragen konnte, schlägt sich das wissenschaftliche Interesse an den Herpesviren jährlich in mehreren hundert Publikationen nieder. Dies große Engagement ist zunächst überraschend, da Herpesvirus-Infektionen, zumindest solche der humanpathogenen Herpesviren, in den meisten Fällen harmlos verlaufen (77,99). Die Primärinfektion mit dem Herpes-simplex-Virus (HSV) findet in der Regel im Alter von 6 - 18 Monaten statt und wird gewöhnlich nicht als solche erkannt, da sie häufig inapparent ist, allenfalls begleitet von schwachen Symptomen. In einigen Fällen ruft sie eine Gingivo-Stomatitis, selten ein chronisches Ekzem der Haut (Kaposi's varizellenartiges Ekzem), eine Kerato-Konjunktivitis oder auch eine Enzephalitis hervor (13). Letztere allerdings kann durchaus tödlich verlaufen.

Cytomegaloviren, ebenfalls zur Gruppe der Herpesviren gehörend, können beim Ungeborenen bleibende Hirnschäden (35) oder auch den Tod verursachen. Doch scheint die pränatale Cytomegalo-Infektion kein sehr häufiges Ereignis zu sein (42).

Das große Interesse an den Herpesviren dürfte deshalb nur zum Teil dem unmittelbaren Schutzbedürfnis des Menschen entspringen, zum Teil läßt es sich mit auffälligen biologischen Eigenarten dieser Virusgruppe erklären. Der milde Verlauf einer HSV-Infektion

beim natürlichen Wirt steht in krassem Gegensatz zu den schweren Symptomen, die dieses Virus in heterologen Wirtsorganismen hervorruft. Für Kaninchen und Hamster ist eine im Labor herbeigeführte HSV-Infektion mit schweren Schäden des Zentralnervensystems und in der Regel mit tödlichem Ausgang verbunden (10,54). Das in einigen afrikanischen Affenarten verbreitete und für diese Tiere harmlose B-Virus wird für den Menschen, etwa nach einem Affenbiß, zu einer ernsthaften Gefahr (54,108). Ein ähnliches Verhalten zeigt ein weiteres Virus der Herpesgruppe, das Pseudorabiesvirus der Schweine: Eine Infektion mit diesem Virus ist weitgehend ungefährlich für den natürlichen Wirt, in der Regel tödlich für Rinder und Schafe (10). Die Resistenz gegenüber "seinem" Virus beruht nicht auf einer verminderten Infizierbarkeit des natürlichen Wirts. Sie wäre unvereinbar mit der hohen Durchseuchungsrate der erwachsenen Bevölkerung, die 80 - 90% beträgt (43). Die Mechanismen dieses angepassten Verhaltens sind noch völlig ungeklärt.

Alle Herpesviren besitzen die Fähigkeit, in latenter Form im Wirtsorganismus zu persistieren, obwohl dieser mit der Bildung neutralisierender Antikörper auf die Herpesinfektion reagiert (98). Der Patient zeigt während dieser Zeit - außer der Bildung von Antikörpern gegen das entsprechende Herpesvirus- keine herpesbedingten Krankheitssymptome. Mit erstaunlicher Regelmäßigkeit reagiert aber der Wirtsorganismus auf äußere Stimuli wie Fieber (77), Bestrahlung mit ultravioletem Licht, körperlichen (29,21) oder seelischen (112) Stress mit erneuter Virusproduktion und dem Auftreten herpesbedingter Läsionen (98,77) - meist an der Stelle der Primärinfektion. Nach einer Stomatitis stellt sich in späteren Jahren bevorzugt ein Herpes labialis ein, nach einer Kerato-Konjunktivitis kommt es leicht zu Rezidiven. Eine besonders

interessante Form des rekurrenten Auftretens finden wir beim Herpes zoster (114). Das klinische Bild seiner Primärinfektion sind die Varizellen. Nach Jahren eines symptomlosen Zustandes kann sich offensichtlich dieselbe Infektion erneut als Herpes zoster manifestieren. Auch hier wissen wir so gut wie nichts über die Mechanismen, nach denen eine derartige "Repression" und "Derepression" des Virus abläuft.

Immerhin scheint es gelungen zu sein, im Falle des Epstein-Barr-Virus (EBV) ein erstes Licht auf die Molekularbiologie dieses Vorganges zu werfen. Das EBV persistiert in den Zellen des Burkitt-Lymphoms, eines Tumors, der bei Kindern in bestimmten Gegenden Afrikas auftritt. Virale Desoxyribonukleinsäure (DNS) kann in den Tumoren und davon abgeleiteten Zelllinien mittels der Nukleinsäurehybridisierung nachgewiesen werden (121,123,91,93). In den Zelllinien wird das Virus spontan (15,22,55,56,59) oder unter der Einwirkung von Bromdesoxyuridin (26,33) reaktiviert. Dennoch lassen sich in den Tumoren elektronenoptisch keine Viruspartikel nachweisen (6,17,23,73). Auch können serologisch keine virusspezifischen Strukturproteine aufgezeigt werden (59). Wir müssen deshalb annehmen, daß in den Zellen nur die virale DNS persistiert, nackt oder - was wahrscheinlicher ist - als Komplex mit zelleigenen oder auch viralen Proteinen. Wie weit dies auch für andere Herpesviren gilt (70) und ob dieser Vorgang überhaupt etwas mit der vorhin erwähnten latenten Infektion zu tun hat, muß noch im einzelnen untersucht werden.

Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen der Fähigkeit einiger Herpesviren, in bestimmten Organismen zu persistieren, und ihrem Vermögen, bösartige Geschwülste hervorzurufen. Oncogene Eigenschaften konnten dem Herpesvirus saimiri (48,52),

ateles (53) und sylvilagus (39) sowie dem Herpesvirus der Marek'schen Geflügellähme (71,101) nachgewiesen werden. Beim EBV sind Versuche, seine onkogene Aktivität gegenüber dem Menschen durch Übertragungsversuche aufzuzeigen, nicht möglich, doch läßt sich die Anwesenheit viraler DNS, wie schon erwähnt, regelmäßig in bestimmten Tumoren, dem Burkitt-Lymphom afrikanischer Kinder sowie dem anaplastischen Nasopharynx-Karzinom, dem sog. Schmincke'schen Lymphoepitheliom, und davon abgeleiteten Zelllinien zeigen. Darüberhinaus gibt es Hinweise, daß das EBV generell für die Etablierung menschlicher lymphoblastoider Zellen verantwortlich ist (12,66,119). Erstmals 1966 wurden Arbeiten publiziert, die den Verdacht eines ätiologischen Zusammenhanges zwischen dem dem Herpes simplex Typ 2 und dem Cervix-Karzinom der Frau begründen (63,64,65,76).

Bei der Planung der in dieser Arbeit beschriebenen Experimente und auf der Suche nach einem geeigneten System, das den Mechanismus der latenten Herpes-simplex-Infektion zu untersuchen gestatten würde, gingen wir von der Annahme aus, daß das Virus mit einiger Wahrscheinlichkeit intrazellulär persistieren dürfte. Dies würde sowohl seine Resistenz gegenüber der Immunabwehr des Wirts erklären, als auch den hohen Antikörperspiegel beim ansonsten symptomlosen Patienten: Die spontane Reaktivierung in einigen Zellen könnte zu einer Virusausschleusung führen und würde einen permanenten Antigenstimulus bewirken. Darüberhinaus wird vom HSV und anderen Herpesviren aufgrund von Reaktivierungsexperimenten vermutet, daß sie intrazellulär persistieren können (5,15,22,24, 26,33,36,68,102,103). Es schien uns deshalb wichtig, die Frage zu untersuchen, ob Zellen, insbesondere menschliche Zellen, eine Infektion mit dem Virus überleben und dieses auf die Dauer beherbergen können. Hierzu boten sich vor allem etablierte Zelllinien an, da sie experimentell leicht zu handhaben sind,

nach der Klonierung eine einheitliche Population darstellen, eine unbegrenzte Lebensdauer haben und außerdem allen somatischen Einflüssen, die nur sehr begrenzt kontrolliert werden könnten, entzogen sind.

Andererseits muß man mit der Möglichkeit rechnen, daß eine zu einer permanenten Linie auswachsende Zelle Funktionen ihres differenzierten Zustandes und damit eventuell auch die Fähigkeit verliert, ein bestimmtes latentes Virus zu beherbergen. Zu diesem Fragenkomplex gibt es bisher erst vereinzelte Untersuchungen, sodaß die Möglichkeit vorläufig ausgeklammert und bei der Versuchsplanung nicht berücksichtigt wurde.

Somit befaßt sich die vorliegende Arbeit mit Untersuchungen zur Persistenz des Herpes-simplex-Virus in etablierten und primären menschlichen Zellen. Sie charakterisiert das biologische Verhalten dieses Virus gegenüber solchen Zellen. Die Typisierung eines persistierenden Herpes-simplex-Virus ist Voraussetzung zur Charakterisierung seiner biologischen Eigenschaften. Deshalb wurde eine entsprechende Methode aufgrund unterschiedlicher Basensequenzen der HSV-Serotypen 1 und 2 entwickelt. Es hat sich gezeigt, daß dieses Verfahren auch für die klinische Diagnostik von Wert ist, da es rasch und zuverlässig die Typisierung von Herpes-simplex-Virusisolaten erlaubt. Als mögliches in-vivo-Modell für die Persistenz von Herpesviren wurde zudem das menschliche Cervix-Karzinom studiert, das zunehmend in Verdacht gerät, durch den Typ 2 des Herpes-simplex-Virus induziert zu sein.

II. Materialien.

1. Virusstämme.

Thea isoliert aus einer primären Keratitis (89),
I-2 aus dem Mund eines Patienten (100),
VR-3 aus dem Hirn eines Enzephalitis-Patienten (88),
Hof Laborstamm unbekannter Herkunft,
Haase aus einer Läsion am Oberarm (90),
MS aus dem Hirn eines Patienten mit Multipler
Sklerose (31),
US aus dem Mund eines Patienten (100),
Scholl und Klee aus Läsionen am Gesäß,
Albers vom Handrücken und
Gerling vom Mittelfinger eines Patienten wurden uns
freundlicherweise von Herrn Prof. K.E.Schneweis, Bonn,
zur Verfügung gestellt. Die Stämme Thea, I-2, VR-3 und
Hof wurden serologisch als dem Typ 1 der Herpes-simplex-
Viren zugehörig diagnostiziert. Die übrigen Stämme ge-
hören dem Serotyp 2 an.

2. Zellen und Biopsien.

2002 und 2003, permanente Linien menschlicher lympho-
blastoider Zellen von Burkitt-Lymphom-
Patienten,
Kaplan und Elaine, Linien lymphoblastoider Zellen von
Mononukleose-Patienten, und
Gibbon Nr.10, eine EBV-transformierte lymphoblastoide
Linie eines Gibbon, verdanken wir
Drs. W. und G. Henle, Philadelphia, U.S.A.
Menschliche Leukozyten wurden aus dem "buffy coat"

frisch sedimentierten Blutes gewonnen.

Die übrigen Zellen sind folgenden Ursprungs:

Vero	Nierenzelllinie der Grünen Meerkatze (116)
Nil	Nierenzelllinie vom Syrischen Hamster (14)
HeLa	Zelllinie von einem menschlichen Cervix-Karzinom (27)
HEL	menschliche Lungenfibroblasten und
HESM	menschliche Haut- und Muskelfibroblasten von der Firma Flow Laboratories, Bonn,
CEF	embryonale Hühnerfibroblasten, freundlicherweise von Herrn Prof. Ch. Jungwirth, Würzburg, zur Verfügung gestellt.
KN	Nierenzellen von jungen Kaninchen.

Die Biopsien von menschlichen Cervix-Tumoren verdanken wir Herrn Dr. W.Gallmeier, Essen.

3. Medien, Lösungen und Reagentien.

MEM, minimal essential medium nach Eagle (20) und RPMI 1629 (41) von der Firma Grand Island Biological Co., Grand Island, N.Y. U.S.A.

Trypsin nach Rous and Jones (84) von Difco, Detroit, U.S.A.

Methylcellulose, Methocel MC 4000 cP von Fluka AG, Buchs SG

Rinderserumalbumin von Armour Pharmac. Co. Chicago, U.S.A.

Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA), Dextransulfat, Heparin, Natriumdodecylsulfat (SDS), Penicillin, Pronase P, Spermidin und Streptomycin von Serva, Feinbiochemica, Heidelberg

DNase (RNase-frei) von Sigma Chem. Co. St.Louis, U.S.A.

Sephadex G-50 von Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden

Photoemulsion Ilford G 5 von Ilford Nuclear Research, Essex, England

1,4-Bis[5-phenyloxazolyl-2(2)]-benzol (POPOP) und
2,5 Diphenyloxazol (PPO) von Packard Instr, Zürich

NP-40 von Shell Chemical Co. New York, N.Y. U.S.A.

Nitrozellulosefilter von Sartorius Membranfilter
GMBH, Göttingen

Milliporefilter von Millipore Corp. Bedford, Mass.
U.S.A.

Oberflächenbehandelte Petrischalen von C.A.Greiner,
Nürtingen

Formamid, 4-Hydroxy-m-phenylendiammoniumdichlorid
(Amidol), Cäsiumsulfat, Tris(hydroxymethyl)-amino-
methan (Tris), Phenol, Seesand, Saccharose, Adenosin-
triphosphat, Cytidintriphosphat, Guanosintriphosphat,
Uridintriphosphat, Ribonuklease, Trichloressigsäure
und alle anderen nicht genannten Chemikalien von
E. Merck, Darmstadt.

Tritiummarkierte Nukleoside und Nukleosidtriphos-
phate von The Radiochemical Center, Amersham, England

III. Methoden.

1. Suspensionskulturen wurden in einem Volumen von 50 ml in luftdicht verschlossenen 250 ml-Erlenmeyerkolben bei 36° gehalten (117,120). Als Nährmedium diente RPMI 1629 mit 10% Kälberserum, 100 E/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Einmal wöchentlich wurden 15 ml der aufgeschüttelten Kulturen in 35 ml frisches Medium ausgesät. Vor der Aussaat hatten die Zellen eine Dichte von $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml.

2. An der Glasoberfläche haftende "Monolayer"-Kulturen wurden in luftdicht verschlossenen Milchverdünnungsflaschen in 20 ml Medium bei 36° gehalten. Als Nährmedium diente entweder RPMI 1629 oder MEM, ebenfalls mit 10% Kälberserum, 100 E/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Die Kulturen wurden umgesetzt, sobald sich auf der Glasoberfläche ein zusammenhängender Zellrasen gebildet hatte. Dazu wurden die Zellen mit 10 ml Hankslösung gewaschen, in 2 ml 0.25%igem Trypsin in Hanks-Lösung abgedaut und zu 20 - 50% in frisches Medium ausgesät.

3. Zur Virusvermehrung diente die Nierenzelllinie "Vero" der Grünen Meerkatze. Die Zellen wurden in 10 - 20 Rouxflaschen mit jeweils 10 ml Virussuspension (Infektionsmultiplizität 2 - 10 Plaque-bildende Einheiten pro Zelle, PbE/Zelle) infiziert. Das Virus wurde eine Std. bei Raumtemperatur adsorbiert, die überstehende Lösung abgegossen und durch 80 ml frisches Medium, 2%ig an Kälberserum, ersetzt. Zur radioaktiven Markierung wurde den Flaschen 1 - 3 Std. p.i. 1.0 - 2.5 µCi/ml ^3H -Thymidin zugefügt.

4. Zur Ernte nichtinfektiöser Viruspartikel wurden die Zellen 1 - 2 p.i. durch Schütteln oder mit einem Schaber von der Glasoberfläche abgelöst, durch niedertourige Zentrifugation sedimentiert und je nach Zellmenge mit 2 - 5 ml einer Lösung von 0.5% Nonidet P-40 in 8% Rohrzucker, 0.01 M Tris-HCl, pH 7.2 versetzt (113,7). Die Zellen wurden in dieser Lösung für 30' bei 37° inkubiert, die Kerne durch 10-minütiges Zentrifugieren bei 2000 Upm abgetrennt und die cytoplasmatischen Überstände in Portionen von 2 ml im 20 - 35%igen Rohrzuckergradienten 70' bei 4° und 32.500 g gefahren (96) (20 - 35 % Rohrzucker in RSB, ribosomal standard buffer nach Warner et al. 110, 0.1%ig an Rinderserumalbumin, 16.000 Upm im SW 25.1 Rotor der Spinco-Ultrazentrifuge). Der Gradient wurde ausgetropft und in 2 ml-Fraktionen gesammelt, von denen ein aliquoter Teil in Bray-Lösung (8) im Szintillationszähler vermessen wurde. Der radioaktive Gipfel im mittleren Teil des Gradienten wurde gesammelt, mit RSB auf mindestens das doppelte Volumen gebracht und erneut im Rotor SW 25.1 bei 2.000 Upm (45.000 g) für 2 Std. sedimentiert. Das Sediment wurde in 0.3 ml RSB aufgenommen, mit 0.1 ml 0.1 M EDTA (Äthylendiamintetraessigsäure), pH 7.5 versetzt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20° eingefroren.

5. Ernte infektiöser Viruspartikel. 2 - 3 Tage p.i. (je nach cytopathischem Effekt der infizierten Zellen) wurde der Zellüberstand für 2 Std. im Rotor 21 der Spinco Ultrazentrifuge bei 45.000 g sedimentiert, das Sediment in 1 ml überstehendem Medium aufgenommen, auf einen 20 - 35 %igen Rohrzuckergradienten gebracht und im Rotor SW 25.1 70' bei 4° und 16.000 Upm gefahren. Die radioaktive und häufig auch sichtbare Bande von Viruspartikeln wurde einige Stunden gegen mindestens drei Wechsel von 250 ml Hanks-Lösung dialysiert und unmittelbar danach in die Versuche

eingesetzt.

6. Plaquetest. Oberflächenbehandelte Petrischalen von 6 cm Durchmesser mit konfluenten Nilzellkulturen wurden mit 0.1 ml Virussuspension infiziert; das Virus wurde 1 Std. bei 37° im CO_2 -Inkubator (95 %iges CO_2 -Luftgemisch) adsorbiert, dann abgesaugt und mit 1 ml Hanks-Lösung nachgewaschen. Die infizierten Zellen wurden mit etwa 5 ml einer 1.5 %igen Suspension von Methylzellulose in serumfreiem Medium überschichtet (97,107). Methylzellulosesuspension: 1.5 g einer mit absolutem Alkohol und Äther gewaschenen Methylzellulose wurden bei $80 - 100^{\circ}$ unter Rühren in 50 ml Wasser suspendiert und für 20' bei 121° autoklaviert. Die Suspension wurde unter Rühren auf 45° abgekühlt und mit dem gleichen Volumen doppeltkonzentrierten Nährmediums MEM versetzt.

Die im CO_2 -Inkubator abgelegten Petrischalen wurden nach 4 - 5 Tagen unter dem Umkehrmikroskop auf Plaques untersucht, mit 10 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) versetzt, umgeschwenkt und durch Absaugen von der sich ablösenden Gelschicht befreit. Auf jede Schale wurden 3 ml einer Lösung von 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Neutralrot in Hanks-Lösung gegeben und bei 36° für 2 Std. inkubiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Plaques ausgezählt.

7. Isolierung viraler, radioaktiv markierter DNS aus Viruspartikeln. Auf einen Rohrzuckergradienten (20 - 35 Gew.% in 100 ml Lösung bestehend aus 86.5 ml RSB, 10 ml 0.1 M EDTA, pH 7.5, 2.5 ml 4 N NaCl und 1.0 ml 5 %ige SDS (Natriumdodecylsulfat) wurden nacheinander pipettiert: 0.15 ml 5 %iges SDS, 0.15 ml Pronase P (10 mg/ml, für 30' bei 37° vorinkubiert), 0.1 ml 0.1 M EDTA und etwa 1 ml der aufgetauten Viruspartikel. Nach einstündiger Inkubation bei

37° wurde das Präparat im Rotor SW 25.1 17 Std. bei 25° und 70.000g zentrifugiert (121). Der Gradient wurde dann ausgetropft, in 2 ml-Portionen gesammelt, und seine Radioaktivität in Bray-Lösung vermessen. Die Fraktionen des radioaktiven Gipfels im unteren Drittel des Gradienten wurden vereint und im Rotor 50 Ti 15 Std. bei 18° und 44.000 Upm (133.000 g) zentrifugiert. Das Sediment wurde in 10 ml Cs_2SO_4 (gelöst in 0.1 M Tris-HCl, pH 8.1, Dichte $\rho = 1.52$, Brechungsindex $n = 1.374$) aufgenommen, im gleichen Röhrchen 50 Std. bei 18° und 44.000 Upm gebandet (106) und anschließend beim Austropfen fraktioniert. Die Fraktionen des radioaktiven Gipfels wurden gesammelt und gegen drei Wechsel von je 500 ml 0.01 x SSC dialysiert (SSC = 0.15 M NaCl, 0.015 M Na-Zitrat). Die Radioaktivität der Präparation wurde in 10 μl , auf Millipore-Filtern getrocknet, in PPO-POPOP (3.0 g PPO, 0.1 g POPOP in 1000 ml Toluol) gemessen, die Reinheit durch Aufnahme eines Spektrums zwischen 220 und 330 nm geprüft und die DNS-Konzentration aus der Absorption bei 260 nm berechnet. ($\text{O.D.}_{260} = 1.0 / 50 \mu\text{g}$). Diese DNS wurde zu DNS-DNS-Nukleinsäurehybridisierungen und zur in-vitro-Transkription mit E.coli-Polymerase benutzt.

8. Extraktion zellulärer DNS. a) Konfluente Gewebekulturzellen in einer Rouxflasche oder b) mindestens drei Tage alte Zellen einer Suspensions-Kultur aus einem 500 ml-Erlenmeyerkolben wurden mit 20 ml Hanks-Lösung gewaschen. c) Ein 0.3 - 0.5 g wiegendes Stück Biopsiegewebe oder eingefrorener E.coli-Bakterienkuchen wurde mit der gleichen Menge salzsäuregewaschenem Seesand im Mörtel bei 4° verrieben (123,124). d) 5 ml Blut wurde mit der gleichen Menge 5 %igem EDTA, pH 7.2, und 40 ml 0.83 %igem NH_4Cl versetzt und im Eisbad oder Kühlschrank aufbewahrt, bis die Mischung durchscheinend wurde, in der Regel 5 -10'. Die Leukozyten wurden

10' bei 1200 Upm sedimentiert und nach Abgießen des Überstandes in 5 ml PBS aufgenommen. Die Prozedur wurde wiederholt, und die Leukozyten nach erneuter Sedimentation der DNS-Extraktion unterzogen, die im weiteren Verlauf in allen vier Fällen die gleiche war (104). Die Proben wurden in 7.0 ml Tris-HCl, 0.1 M, pH 8.1, 1.0 ml 0.1 M EDTA und 2.0 ml 5 %igem SDS versetzt und eine Std. bei 37° inkubiert, nach Zugabe von 1.0 ml einer 1 %igen, 30' bei 37° vorinkubierten Pronase P eine weitere Stunde bei 37° gehalten. Der Ansatz wurde mit der gleichen Menge doppeltdestilliertem trisgesättigtem Phenol unter vorsichtigem Schwenken vermischt, einige Minuten in Eis gekühlt und 5' bei 2000 Upm zentrifugiert. Die wässrige Schicht wurde abgenommen und erneut unter den gleichen Bedingungen mit Phenol extrahiert. Die so erhaltene klare, wässrige Lösung wurde auf 1.0 N NaCl eingestellt, und die DNS durch Zugabe von 2.5 Volumina eisgekühlten Äthanol ausgefällt. Sie wurde unter vorsichtigem Umrühren auf einen Glasstab aufgespult, in frischem Äthanol geschwenkt, in 5.0 ml 0.1 x SSC gelöst und über Nacht gegen 0.1 x SSC dialysiert. Nach Aufnahme eines UV-Spektrums zur Reinheitskontrolle und Bestimmung des DNS-Gehaltes aus der Absorption bei 260 nm wurde die DNS eingefroren oder gleich in geeigneten Portionen denaturiert und auf Nitrozellulosefilter gebracht, wie unter III,14 beschrieben.

9. Extraktion zellulärer RNS. Mit PBS gewaschene Zellen wurden nach Zugabe von 10 ml Acetatpuffer (0.05 M Na-Acetat, 0.01 M EDTA, pH 5.1), 2.0 ml 5 %igem SDS und 10 ml trisgesättigtem Phenol 10' bei 60° inkubiert, auf 0° gekühlt und 3' bei 2000 Upm zentrifugiert (111). Die wässrige Schicht wurde erneut mit 10 ml Phenol extrahiert und mit NaCl auf 0.15 M eingestellt. Nach Zugabe des doppelten Volumens Äthanol wurde das Gemisch über Nacht bei -20° gelagert, am nächsten Mor-

gen 10' bei 5.000 Upm zentrifugiert. Das Sediment wurde in 5.0 ml RSB aufgenommen und 60' bei 37° mit DNase, 20 µg/ml, inkubiert. Nach erneuter Extraktion mit 10 ml Phenol wurde die wässrige Phase gegen 0.01 x SSC dialysiert.

10. In vitro Transkription viraler DNS in komplementäre RNS (122) Eine Lösung von 10 µg viraler DNS in 0.01 x SSC wurde mit je 40 nmol der Nukleosidtriphosphate CTP, UTP, ATP und GTP versetzt. Zwei der Triphosphate waren tritiummarkiert, ³H-CTP mit 15 Ci/mmol und ³H-UTP mit 20.6 Ci/mmol. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer zur Trockne eingedampft, mit 0.5ml Polymerasepuffer nach Burgess (9) und 10 µl DNS-abhängiger RNS-Polymerase aus E. coli versetzt (9). Die Lösung wurde unter leichtem Schütteln 3 Std. bei 37° inkubiert, dann mit 0.5 ml RNase-freier DNase-Lösung in Polymerasepuffer (100 µg/ml) versetzt und weitere 30' bei 37° inkubiert. Nach zehnmütigem Ausschütteln mit dem doppeltem Volumen doppelt destillierten, tris-gesättigten Phenols wurden die Phasen durch kurzes Zentrifugieren bei 2.000 Upm getrennt. Die wässrige Phase wurde auf eine Sephadex-Säule G-50 (1.0 x 1.5 cm, im Gleichgewicht mit 0.1 x SSC) gegeben und mit 0.1 x SSC eluiert. Das Eluat wurde in 5-Tropfenfraktionen gesammelt, die Radioaktivität vermessen, und der aktive, im Ausschlußvolumen erscheinende Gipfel polymeren Materials gesammelt. Das Präparat wurde in kleinen Portionen abgefüllt und bei -70° eingefroren.

11. Säurefällbarkeit der c-RNS. 50 µl der komplementären RNS (c-RNS) wurden mit 1.0 ml 5 %iger Tri-chloressigsäure versetzt. Die Radioaktivität wurde in der Gesamtlösung sowie nach Zugabe von 0.015 % Rinderserumalbumin, halbstündiger Inkubation im

Eisbad und Filtration durch ein Millipore-Filter bestimmt.

12. Die Sedimentationskonstante der c-RNS wurde im 10 - 25 %igen Rohrzuckergradienten durch Zentrifugation über 16 Std. bei 25° und 22.000 Upm (Rotor SW 25.1) bestimmt. Die entsprechende Menge Rohrzucker wurde in einer Mischung von 180 ml RSB, 20 ml 0.1 M EDTA, 5.0 ml 4.0 M NaCl und 8.0 ml 5 %igem SDS gelöst. Als Marker diente ribosomale RNS aus Säugetierzellen.

13. RNAse-Sensitivität der c-RNS. Etwa 5×10^5 Ipm c-RNS wurden in 10 ml 2 x SSC bei 37° mit 20 µg/ml RNAse inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurden Proben von 1.0 ml entnommen und nach Zugabe eines Tropfens 0.5 %igem Rinderserumalbumin (RSA) mit 10 %igem TCA gefällt. Das Präzipitat wurde auf Millipore-Filtern gesammelt, dreimal mit 5 ml 5 %igem TCA gewaschen, bei 80° getrocknet und in PPO-POPOP vermessen. Ein Parallelansatz wurde vor der RNAse-Inkubation für 10' im kochenden Wasserbad denaturiert. Zwei weitere Ansätze wurden für 30' bei 37° mit 20 µg/ml DNase behandelt, dann auf 2 x SSC eingestellt und wie die beiden zuerst beschriebenen Proben weiterbehandelt. Alle Messungen wurden durch Doppelbestimmungen gesichert.

14. DNS-DNS-Nukleinsäurehybridisierung. (87,121)
100 µg zellulärer DNS wurden in 8.0 ml 0.1 x SSC für 15' im kochenden Wasserbad denaturiert, in Eiswasser rasch abgekühlt, mit 2.0 ml 10 x SSC auf 2 x SSC eingestellt. Je 4.5 ml (45 µg DNS) wurden unter Anwendung eines sehr schwachen Unterdruckes durch ein zuvor in 2 x SSC eingeweichtes Nitrozellulosefilter gesaugt und für 4 Std. bei 80° getrocknet. Die Filter wurden 6 Std. in einer Lösung von 0.04 % RSA und 0.1 % SDS in 1.0 ml 3 x SSC bei 61° inkubiert.

Eine geeignete Menge ^3H -markierter viraler DNS wurde in 0.1 x SSC 15' unter Eiskühlung mit Ultraschall fraktioniert, 15' im kochenden Wasserbad denaturiert und in Eiswasser rasch abgekühlt. Die Salzkonzentration wurde auf 3 x SSC eingestellt, und die Radioaktivität in 50 μl gemessen. Von dieser Lösung wurden 0.1 oder 0.2 ml zu jeder Probe zellulärer DNS (in 1.0 ml Inkubationsmischung) gegeben und 20 Std. bei 61° inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden die Filter dreimal in 0.003 M Tris-HCl, pH 9.3 geschwenkt und auf dem Millipore-Filtrationsgerät von jeder Seite mit je 100 ml Tris gewaschen. Die Filter wurden bei 80° getrocknet und in PPO-POPOP vermessen.

Alternativ wurde eine kombinierte Denaturierung und Fragmentierung der viralen DNS auch in 0.5 N NaOH (47) durch Behandlung für 30' bei 100° erreicht. Nach raschem Abkühlen wurde die Lösung durch Zugabe von 1 N HCl annähernd neutralisiert und mit 0.1 Volumina 1 N Tris-HCl, pH 8.1 versetzt.

15. DNS-RNS-Hybridisierung in wässriger Lösung (28).
Denaturierte zelluläre DNS wurde auf Nitrozellulosefiltern, wie unter III,14 beschrieben, fixiert. Die Filter wurden nicht mit RSA und SDS vorinkubiert. Eine geeignete Menge c-RNS wurde in 0.1 x SSC für 15' im kochenden Wasserbad denaturiert, rasch abgekühlt und auf 4 x SSC, 0.1 % SDS eingestellt. Auf jedes Filter wurde 1.0 ml dieser Lösung gegeben. Die Filter wurden 20 - 23 Std. bei 65° gehalten, nach Abkühlung auf Raumtemperatur dreimal in 2 x SSC geschwenkt, von jeder Seite mit 50 ml 2 x SSC gewaschen, 30' bei Raumtemperatur mit 5.0 ml RNase (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 2 x SSC) behandelt, erneut in 2 x SSC geschwenkt und von beiden Seiten mit je 50 ml 2 x SSC gewaschen. Nach dem Trocknen wurden die Filter in PPO-POPOP vermessen.

16. DNS-RNS-Hybridisierung in 50 %igem Formamid.

Der Unterschied zum Verfahren III,15 bestand darin, daß die RNS in 70 %igem Formamid, 2.5 mM an EDTA, über 15' bei 80° denaturiert wurde und auf 50 %iges Formamid eingestellt wurde (51). Die Hybridisierungsreaktion zog sich bei 45° über 5 - 6 Tage hin. Die weitere Behandlung entsprach der unter III,15 beschriebenen.

17. DNS-RNS-Hybridisierung in situ (44,69,122). Die zu testenden Zellen wurden in 10 ml Hanks-Lösung gewaschen, in kaltem Methanol-95 %iger Essigsäure 3 : 1 fixiert, über Nacht bei 4° gehalten und am folgenden Tag auf Objektträger gebracht und hitzegetrocknet. Zur Denaturierung der DNS wurden die Objektträger 15' in 0.014 N NaOH getaucht, in 70 und 96 %igem Äthanol geschwenkt und an der Luft getrocknet.

Viruspezifische c-RNS wurde in 0.1 x SSC 15' lang im kochenden Wasserbad denaturiert und auf 4 x SSC eingestellt. Auf jeden Objektträger wurden 0.1 ml dieser Lösung mit 5×10^4 Ipm aufgetragen, mit einem Deckgläschen abgedeckt und 20 - 23 Std. bei 65° in einer feuchten Kammer inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Objektträger dreimal in 2 x SSC geschwenkt, in einer Lösung von 20 µg/ ml RNase in 2 x SSC 30' bei Raumtemperatur inkubiert und wiederum gewaschen: einmal in 2 x SSC, zweimal in dest. Wasser und zweimal in ~~in~~ 96 %igem Äthanol und an der Luft getrocknet.

18. Autoradiographie der DNS-RNS-Hybride (118). Die Objektträger aus dem Verfahren III,17 wurden bei völliger Dunkelheit in eine 45° warme 1:1-Verdünnung der Ilford-Emulsion G-5 in dest. Wasser getaucht, auf der Rückseite abgewischt und 30' zur Erstarrung der Emulsion bei Raumtemperatur belassen. Dann wurden sie in einem lichtdichten Behälter bei 4° bis zu drei

Wochen exponiert.

Entwickelt wurden die Objektträger 4' bei 20° und völliger Dunkelheit im Amidol-Entwickler (1.35 g Amidol, 5.4 g Na_2SO_3 und 2.4 ml einer 10 %igen KBr-Lösung werden zusammengegeben und mit Wasser auf 300 ml aufgefüllt). Sie wurden in dest. Wasser gespült, in 10 %igem Fixierbad fixiert und nach der Schlußwässerung in dest. Wasser einer modifizierten Giemsa-Färbung unterzogen.

19. Modifizierte Giemsa-Färbung. Die Objektträger wurden in der angegebenen Reihenfolge für 3' in folgenden Lösungen getaucht:

1. 50 %iges Äthanol-Zitratpuffer 1:1

Zitratpuffer: 86 ml 0.1 M Zitronensäure

115 ml 0.2 M Na_2HPO_4

ad 1000 ml, pH 5.75

2. 95 %iges Äthanol

3. Zitratpuffer

4. Schritte 1 - 3 wiederholen

5. Zitratpuffer

6. Färbelösung

90 ml Zitratpuffer

3 ml Methanol

5 ml frisch filtrierte Giemsa-Stammlösung

pH 5.75

Die Objektträger wurden in dest. Wasser gespült und mit Eukitt eingedeckt.

IV. Ergebnisse.

1. Virusvermehrung.

Obwohl alle permissiven Zellkulturen nach spätestens 24 Std. in durchweg 100 % der Zellen cytopathische Schädigungen zeigten und keine der Kulturen die Infektion überlebte, konnten z. T. erhebliche Unterschiede in der Ausbeute viraler Partikel festgestellt werden (Tab.1). Die besten Virusproduzenten waren primäre Zellen nichtmenschlichen Ursprungs, embryonale Hühnerfibroblasten und frisch ausgesäte Nierenzellen von jungen Kaninchen. Von den etablierten Linien zeigten Verozellen die höchste Virusproduktion.

Unterschiedliche Ausbeuten an infektiösem Virus in Abhängigkeit von infizierter Zelle, infizierendem Virus und von den Wachstumsbedingungen sind auch von anderen Autoren berichtet worden (75,82). In einigen Fällen konnte gezeigt werden, daß diese Differenzen auf einem unterschiedlichen Gehalt der Viruspräparation an defekten Partikeln beruht. (25). Bei unseren Versuchen interessierte in erster Linie die Ausbeute an viraler DNS und damit an viralen Partikeln ohne Rücksicht auf ihre Infektiosität. Deshalb wurde die Virusausbeute - nach Zugabe von ^3H -Thymidin zu Beginn der viralen DNS-Synthese- an der Radioaktivität im Bereich der viralen Bande im Rohruckergradienten gemessen. Offensichtlich wird je nach infizierter Zelle und infizierendem Virus eine unterschiedliche Zahl von Viruspartikeln gebildet, oder es werden Teilchen unterschiedlicher Fragilität synthetisiert, die während der Isolierung mehr oder weniger rasch desintegrieren und verloren gehen.

Zellkultur	Herkunft	infiziert mit Virus (Typ und Stamm)	virusgebundene Radioaktivität in	
			Zellen $\text{Ipm} \cdot 10^{-4}$	Medium $\text{Ipm} \cdot 10^{-4}$
KN	embryonale Kaninchennieren- zellen	HSV-1 (L-2)	18.0	
CEF	embryonale Hühnerfibro- blasten	HSV-2 (Haase)	23.4	5.6
HEL	embryonale menschliche Lungenfibroblasten	HSV-2 (Haase)	4.6	
HESM	embryonale menschl. Haut- und Muskelfibroblasten	"	1.7	0.2
Nil	etablierte Zellen des syrischen Hamsters	"	1.2	0.3
Hela	etabl. Zellen eines menschl. epidermoiden Karzinoms	"	1.4	0.3
Vero	etabl. Zellen der Grünen Meerkatze	"	12.8	1.2
"	"	HSV-2 (US)	2.7	
"	"	HSV-2 (MS)	4.5	

Tab. 1: Ausbeute viraler Partikel pro Rouxflasche infizierter Zellen. konfluente Zellen unter-
schiedlicher Herkunft wurden mit 5 - 10 PbE/Zelle infiziert, 3 Std. p.i. mit 2 $\mu\text{Ci/ml}$ tritium-
markiertem Thymidin versetzt und am folgenden Tag geerntet. Die angegebenen Werte repräsentieren
die Gesamtradioaktivität in der virushaltigen Fraktion des Rohrzuckergradienten.

Die angeführten Werte sind Vergleichszahlen und geben nur angenähert die Menge inkorporierter Radioaktivität in die virale DNS wieder. Der hohe Auslöschungsfaktor bei der Bestimmung der Radioaktivität, bedingt durch den Gehalt an Rohrzucker in der zu messenden Probe, wurde nicht berücksichtigt.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden für die Virusproduktion ausschließlich Verozellen benutzt. Ihrer im Vergleich zu primären Hühner- und Kaninchenzellen geringeren Virusaussbeute steht die sehr viel einfachere Handhabung etablierter Zellkulturen gegenüber.

Zur Isolierung der viralen Partikel wurde der cytoplasmatische Extrakt aufgearbeitet, der unter den angewandten Bedingungen stets das meiste Virus enthielt (Tab.1).

2. Isolierung der viralen DNS.

Die Darstellung hochgereinigter viraler DNS ist Voraussetzung für ein Großteil der in dieser Arbeit beschriebenen Experimente. Da die präparative Trennung von zellulärer und viraler DNS aufgrund ihrer Dichteunterschiede aussichtslos erschien, wurden zunächst Viruspartikel in möglichst reiner Form durch Geschwindigkeitszentrifugation im Saccharosegradienten isoliert. Abb. 1 zeigt die Sedimentation des Virus im 20 - 35 %igen Rohrzuckergradienten. In diesem Falle wurde der Kultur radioaktives Thymidin zugleich mit dem infizierenden Virus zugefügt, um zu gewährleisten, daß auch noch zelluläre DNS markiert wurde, bevor das Virus die zelluläre DNS-Synthese zum Erliegen brachte (80). Auf diese Weise kann die Abtrennung viralen Materials in Form einer Bande von dem übrigen DNS-haltigen Material sichtbar ge-

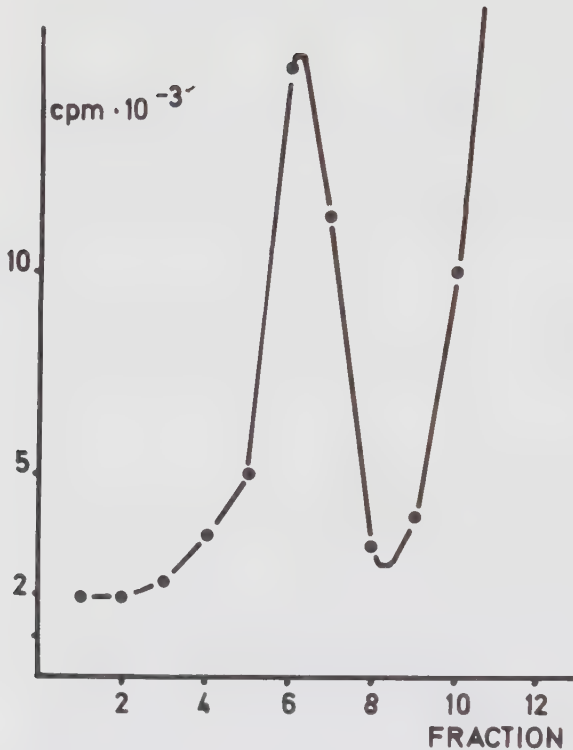


Abb. 1 : Geschwindigkeitssedimentation ³H-Thymidin-markierter (1.5 µCi/ml) Partikel (HSV-2, Stamm MS) im 20-35 %igen Saccharosegradienten (Rotor SW 25.1, 16.000 Upm, 70', 4°). 1x10⁸ Zellen wurden am dritten Tag p.i. geerntet und in NP-40 lysiert. Der cytoplasmatische Extrakt wurde auf den Gradienten gegeben.

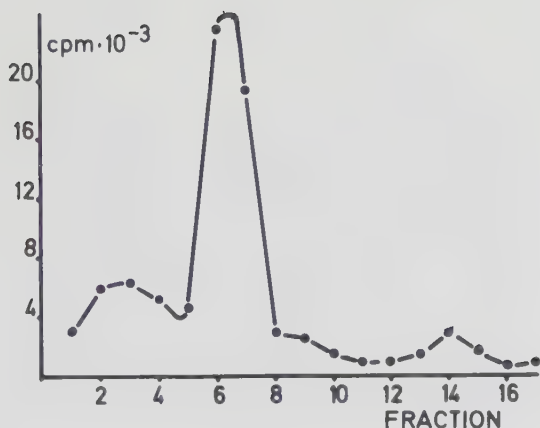


Abb. 2 : Geschwindigkeitssedimentation viraler DNS im SDS-Saccharosegradienten (20-35 %ige Saccharose in RSB, 0.01 M EDTA, 0.1 N NaCl, pH 7.5). Virale, Thymidin-markierte Partikel wurden auf dem präformierten Gradienten lysiert wie unter III,7 beschrieben. Rotor SW 25.1, 17 Std., 25⁰, 70.000 g.

macht werden. Das Profil zeigt eine scharfe Bande bei vergleichsweise geringen Mengen über den Gradienten verschmierter Radioaktivität.

Die nachfolgende Sedimentation im SDS-Saccharosegradienten (Abb. 2) bewirkt eine Desintegration der viralen Partikel in DNS und Protein. Da erstere keinerlei Scherkräften unterworfen wurde, wanderte sie als homogener Gipfel, dessen Sedimentationskonstante von anderen Autoren mit 55-56 S bestimmt worden ist (46,50).

Ein kleiner Gipfel im oberen Teil des Gradienten dürfte stark fragmentierte zelluläre DNS darstellen, da sie mit viraler DNS nicht hybridisiert. Sie war im Rahmen dieser Arbeit nicht interessant und wurde deshalb nicht weiter untersucht.

Die komplette Sedimentation der viralen DNS aus den vereinten Fraktionen des radioaktiven Gipfels wurde durch Überprüfung der Radioaktivität im Überstand gezeigt. Nach der Sedimentation unter den angegebenen Bedingungen (siehe III,7) wurden aus dem Zentrifugenröhrchen von oben 1 ml-Fraktionen abgenommen und auf ihre Radioaktivität vermessen. Die gesamte Aktivität fand sich im Sediment. Es wurde in Cs_2SO_4 einer Dichte von $\rho = 1.52$ suspendiert und unter den angegebenen Bedingungen zentrifugiert (Abb. 3). Im Bereich der Dichte von $\rho = 1.48$ findet sich ein symmetrischer radioaktiver Gipfel. Eine stärkere Kontamination mit zellulärer DNS scheint nicht vorzuliegen. Sie würde sich als Schulter auf der leichteren Seite des Gipfels zeigen. Die UV-Absorption bei 260 nm wurde gegen Wasser gemessen. Dies könnte die erhöhte Basislinie von O.D. = 0.2 erklären.

Im unteren Teil des Gradienten findet sich ein Gipfel erhöhter Absorption bei 260 nm. Hierbei dürfte es sich um RNS handeln. Dafür spricht neben der Bandung im Bereich von $\rho = 1.7$ die Abwesenheit von Radioaktivität sowie das UV-Spektrum (Abb. 4b). Die Substanz wurde nicht weiter untersucht, da ihre Abtrennung offensichtlich problemlos ist.

Die so gewonnene virale DNS hatte eine spezifische Radioaktivität von 2.5×10^4 bis 1.0×10^5 Ipm/ μg . Die Ausbeute betrug 1.0 bis 3.0 μg /Rouxflasche, was 2×10^2 bis 5×10^2 Viruspartikeln pro Zelle entspricht.

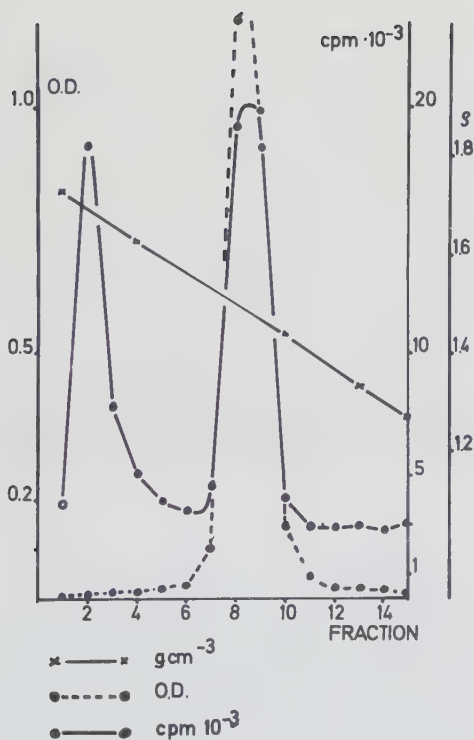


Abb. 3 : Gleichgewichtszentrifugation viraler DNS im Cs_2SO_4 -Gradienten. Thymidinmarkierte virale DNS (siehe III, 7) wurde in einer Cs_2SO_4 -Lösung der Dichte $\rho = 1.52$ über 50 Std. bei 18° und 44.000 Upm im Rotor 50 Ti gebandet.

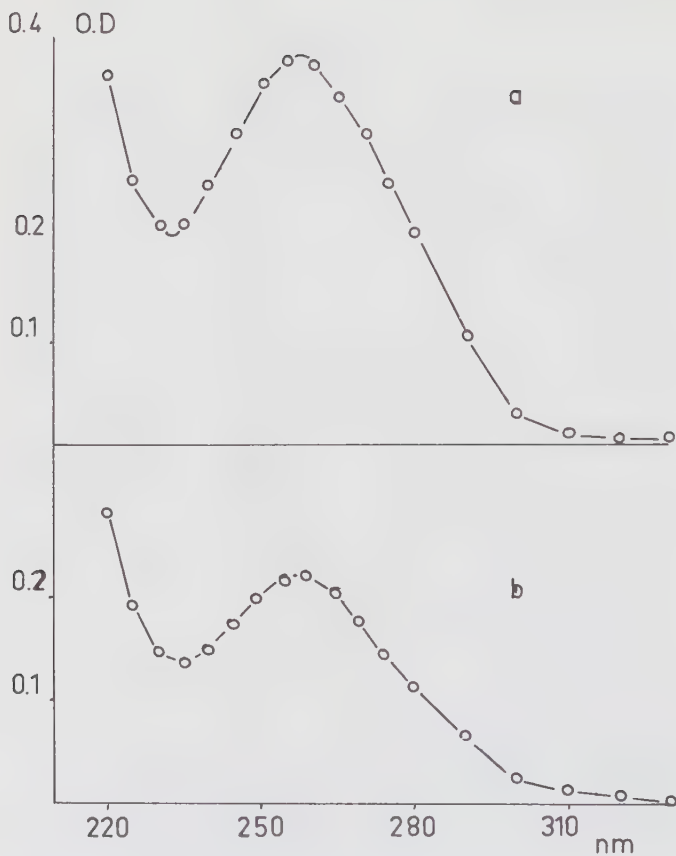


Abb. 4 : UV-Spektrum der gereinigten viralen DNS (a) sowie des im Cs_2SO_4 -Gleichgewichtsgradienten bei höherer Dichte bandenden Materials (b).

DNS aus	gebundene Radioakt. Ipm	% der Eingabe
Vero (Affenzelllinie)	68	1.3
Mäusemilz	61	1.2
E. coli	5	0.1
Hep-L-2 (HSV-1-infiz. Zellen)	529	10.3
HEL-MS (HSV-2-infiz. Zellen)	1475	28.6

Tab. 2 : DNS-DNS-Hybridisierung markierter viraler HSV-2-DNS mit zellulärer DNS verschiedenen Ursprungs. 45 µg zellulärer DNS wurden, auf Filter fixiert, mit 5.500 Ipm viraler DNS für 22 Std. bei 61.5° hybridisiert.

Im abschließenden Reinheitstest wurde sie einer Hybridisierungsreaktion mit zellulärer DNS unterworfen (Tab. 2). Der Test zeigt, daß das Präparat aus weitgehend gereinigter viraler DNS besteht. Allerdings läßt die gegenüber E.coli-DNS erhöhte Hybridisierung mit DNS aus Mäuse- und Affenzellen entweder auf eine schwache Kontamination der viralen mit zellulärer DNS oder auf das Vorliegen von Homologien zwischen zwischen Virus- und Wirtszell-DNS schließen. Das reaktive Material konnte in keiner der zahlreichen DNS-Präparationen beseitigt werden.

An Reinheitskriterien für die virale DNS stehen somit zur Verfügung:

1. die niedrige Hybridisierungsrate der viralen mit zellulärer DNS,
2. das UV-Spektrum (Abb. 4a), insbesondere das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu dem bei 280 nm (Es sollte bei proteinfreien Präparaten nicht weniger als 1.9 betragen) und
3. der symmetrische Gipfel der DNS im Cs_2SO_4 -Gleichgewichtsgradienten.

3. In vitro Transkription viraler DNS in hochmarkierte virusspezifische RNS.

Vorversuche hatten ergeben, daß die RNS-Menge in den ersten drei Stunden der Reaktion linear zunahm, sich dann aber keine weitere RNS mehr ansammelte. Die Chromatographie der c-RNS an Sephadex G-50 (Abb. 5) zeigte einen Einbau von etwa 8 - 10 % der Radioaktivität in ein polymeres Material, das im Ausschlußvolumen von G-50 laufend ein höheres Molekulargewicht als etwa 50.000 haben mußte. Die spezifische Aktivität betrug 2.1×10^7 Ipm/ μg . Das Material ließ sich zu über 99 % mit Trichloressigsäure fällen. Im Rohrzuckergradienten (Abb. 6) erwies es sich als Mischung von Molekülen sehr unterschiedlicher Größe, wobei solche mit einer Sedimentationskonstante von 6 S am stärksten vertreten waren. Diese Sedimentationskonstante entspricht nach einer Formel von Leighton und Rubenstein (49) einem Molekulargewicht von 2.0×10^5 .

Im Cs_2SO_4 -Gleichgewichtsgradienten wurde auch nach drei Tagen bei 35.000 Upm in der Ultrazentrifuge keine scharfe Bande erhalten (Abb 7). Die RNS-Ketten sind offenbar zu klein, um noch mit ausreichender Geschwin-

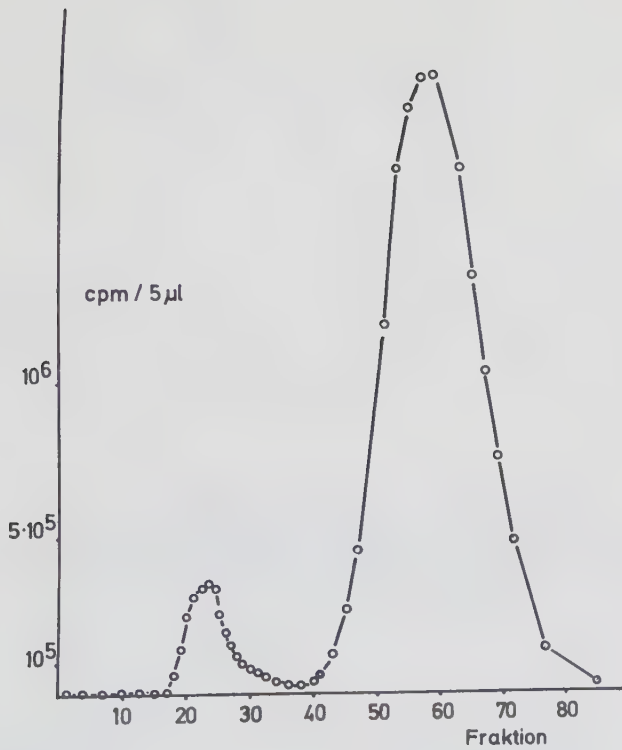


Abb. 5 : Chromatographie des Transkriptionsproduktes (III,10) an Sephadex G-50.

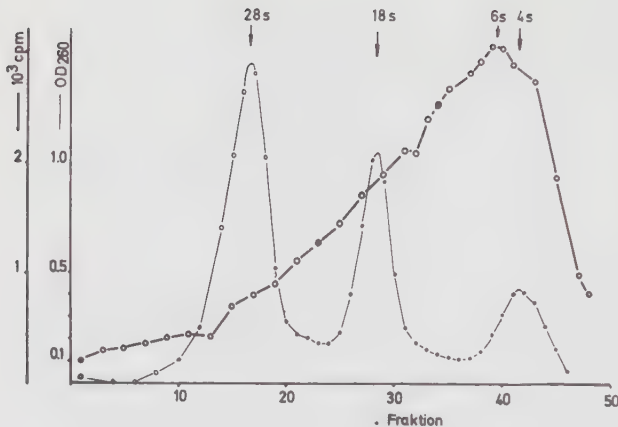


Abb. 6 : Zentrifugation der virusspezifischen radiaktiv markierten c-RNS im präformierten Rohrzuckergradienten (10-25 % Saccharose, Rotor SW 25.1, 16 Std. bei 25° und 22.000 Upm, siehe III,12) Als Marker diente ribosomale RNS aus Säugetierzellen.

digkeit in den ihrer Dichte entsprechenden Bereich des Gradienten zu wandern.

Der Resistenztest gegenüber Einstrang-spezifischer RNase A aus Rinderpankreas (2) ergab einen Anteil von 29 % doppelsträngiger RNS (Abb. 8a). Durch Behandlung der c-RNS unter denaturierenden, d.h. Bedingungen, unter denen RNS-Doppelstränge in Einzelstränge gespalten werden (Inkubation der wässrigen

Lösung bei 100° für 10') wurde dieser Anteil auf 18 % gesenkt. Für diesen relativ hohen Gehalt an RNS-Doppelsträngen nach der Denaturierung gibt es zwei mögliche Erklärungen: 1) RNS-Bereiche hohen G+C-Gehaltes widersetzen sich einer Denaturierung unter den angewandten Bedingungen zu einem gewissen Grad, und 2) kann eine partielle Renaturierung während der Abkühlung der RNS nicht ausgeschlossen werden.

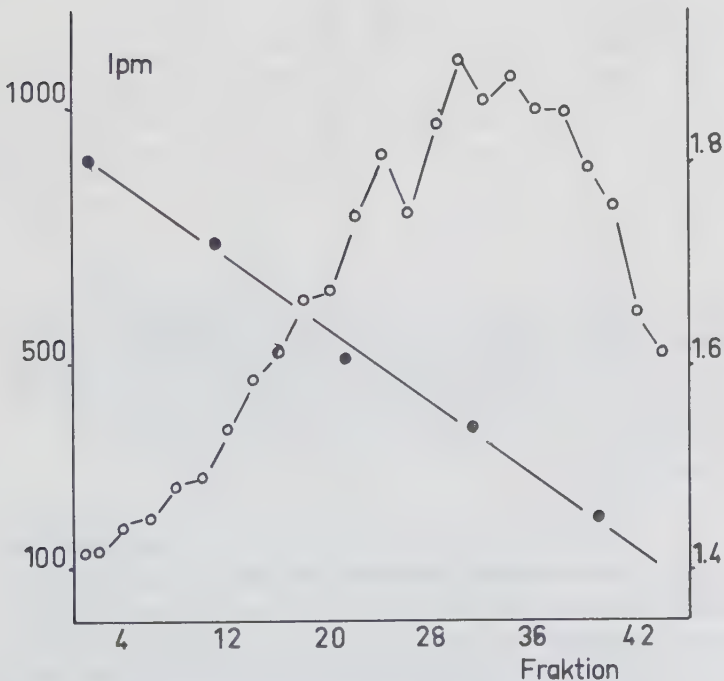


Abb. 7: Gleichgewichtszentrifugation der c-RNS in Cs_2SO_4 . 50 μl c-RNS wurden in Cs_2SO_4 -Lösung der Dichte = 1.6 für 72 Std. bei 35.000 Upm und 4° im SW 50 Rotor zentrifugiert. Nach dem Austropfen der Lösung wurde die Dichte ●-●-● und die Radioaktivität o-o-o der Fraktionen bestimmt.

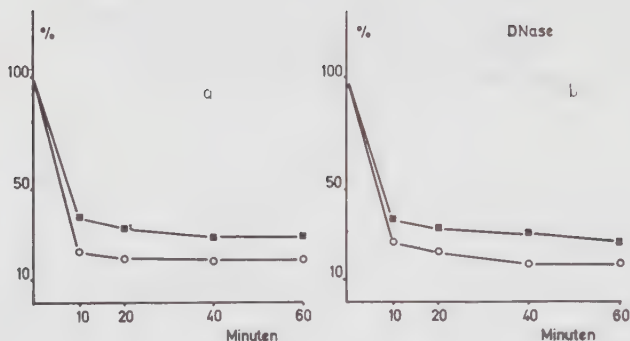


Abb. 8 : a) RNase-Sensitivität der c-RNS. Gemessen wurde die Säurefällbarkeit der c-RNS nach RNase-Einwirkung (20 µg/ml in 2 x SSC, bei 37°) unterschiedlicher Dauer (●-●-●). In einem Parallelansatz wurden die Proben nach Denaturierung bei 100° für 10' der gleichen Behandlung unterworfen (○-○-○). b) c-RNS wurde für 30' bei 37° einer DNase-Behandlung unterzogen (10 µg/ml), dann behandelt wie unter a) beschrieben.

Durch Denaturierung der c-RNS für 15' bei 100° stieg die Hybridisierungsrate gegenüber DNS aus virusinfizierten Zellen von 16.5 % auf 21.5 % der Eingabe.

DNS-RNS-Hybride in der c-RNS-Präparation wären ebenfalls RNase-resistent gewesen. Um ihr Vorliegen auszuschließen, wurde die c-RNS einer DNase-Behandlung unterzogen (2), bevor erneut ihre Resistenz gegenüber

RNase vor und nach Denaturierung bei 100° bestimmt wurde. Wir fanden nach der DNase-Behandlung keine Veränderung im Verhalten der c-RNS gegenüber RNase (Abb. 8b) und schließen daraus auf Abwesenheit von DNS-RNS-Hybriden im c-RNS-Präparat.

Die Spezifität der c-RNS wurde im DNS-RNS-Hybridisierungsexperiment getestet (Tab. 3).

DNS aus	gebund. Radio- aktiv. Ipm	% der Eingabe
E. coli	76 70	0.08
HEL (primäre menschl. Fibrobl.)	311 313	0.35
HEL + Haase (HSV-2-infiz. Zellen)	21.454 20.670	24.3

Tab. 3 : DNS-RNS-Hybridisierung von c-RNS mit DNS unterschiedlicher Herkunft. 45 µg DNS wurden, auf Filtern fixiert, mit 90.000 Ipm c-RNS für 5 Tage bei 45° in 50 %igem Formamid inkubiert.

Der Versuch zeigt eine spezifische, der viralen DNS komplementäre RNS an. Die Hybridisierungsrate der c-RNS ist mit menschlicher DNS höher als mit DNS aus E. coli. Hierfür gibt es drei mögliche Erklärungen: 1. Die virale DNS hat eine wenn auch geringe Basenhomologie mit Säugetier-DNS. 2. Das virale DNS-Präparat und damit auch das entsprechende Transkriptionsprodukt waren trotz sorgfältiger Reinigungsoperationen mit kleinen Mengen zellulärer

DNS bzw. säugetierspezifischer RNS kontaminiert.

3. Die zur Virusvermehrung benutzte Vero-Zelllinie war durch Mycoplasmen kontaminiert, und dem entsprechend enthielt die virale DNS Mycoplasmen-DNS, das Transkriptionsprodukt Mycoplasmen-spezifische c-RNS. Sie würde mit der DNS aus etablierten Linien reagieren, wenn diese ihrerseits Mycoplasmenbefall aufwiesen. Allerdings läßt sich hiermit nicht die in späteren Experimenten beobachtete erhöhte Hybridisierung mit DNS aus menschlichen primären Leukozyten von Erwachsenen und Neugeborenen erklären.

Somit scheint die Anwesenheit geringer Verunreinigungen zellulärer DNS im viralen DNS-Präparat der wahrscheinlichere Grund. Diese Kontamination könnte eine Minderung der Virus-Spezifität der c-RNS zur Folge haben, dann nämlich, wenn die zelluläre DNS bevorzugt transkribiert würde. Außerdem besteht die Möglichkeit, daß das virale DNS-Präparat neben geringen Mengen radioaktiv markierter weitere Anteile nicht markierter zellulärer DNS enthält. Diese DNS wäre nicht nachgewiesen worden, hätte in der DNS-DNS-Hybridisierung die Meßdaten nicht verfälscht und somit nicht gestört. E. coli-Polymerase würde auch diese DNS in hochmarkierte RNS transkribieren, die nun durch Minderung der Virus-Spezifität des Präparates störend in Erscheinung träte. Offensichtlich wird aber keine der beiden Fehlermöglichkeiten verwirklicht: Die Erhöhung der Hybridisierungsrate gegenüber zellulärer DNS ist bei der c-RNS nicht stärker ausgeprägt als bei der viralen DNS.

Zusammenfassend können wir sagen, daß die Transkription mit E. coli-Polymerase eine hochmarkierte, virus-

spezifische RNS unterschiedlicher Größe ergab, die zu etwa 29 % aus RNS-RNS-Doppelsträngen besteht. Wesentliche Unterschiede zwischen den Reaktionsprodukten verschiedener Transkriptionsreaktionen wurden nicht beobachtet.

Die Transkription viraler DNS in komplementäre RNS mittels eines bakteriellen Enzyms schafft uns Zugang zu virusspezifischer, hochmarkierter Nukleinsäure. Mit ihrer Hilfe können wir die Empfindlichkeit aller Nachweisreaktionen auf virale Nukleinsäure, die sich molekularer Hybridisierung bedienen, wesentlich steigern. Andere Reaktionen wie z.B. die Hybridisierung in situ zum Nachweis viraler DNS direkt in den auf Objektträgern fixierten Zellen wird durch c-RNS überhaupt erst ermöglicht. Mit Enzymen, die spezifisch einsträngige RNS abbauen, kann man die freien Bereiche unvollständig hybridisierter RNS-Stränge abbauen und damit den unspezifischen Hintergrund weit herunterdrücken (28).

Wir wissen nicht, ob bei der Transkription Startsignale auf der DNS als solche erkannt werden und ob das gebildete Produkt in dieser Beziehung dem Transkriptionsprodukt in vivo gleicht. Es ist aber bekannt, daß die DNS der Herpesviren in vivo wenigstens zum Teil als polycistronischer Messenger abgelesen wird und die entsprechende nukleäre RNS eine Sédimentationskonstante von 40 - 60 S besitzt (109), während die meisten in vitro gebildeten c-RNS-Moleküle ihrer Größe nach nur einen Bruchteil davon ausmachen. Wir müssen deshalb annehmen, daß die in-vitro-Transkription entweder zufällig und unspezifisch startet, wobei die RNS alle DNS-Sequenzen repräsentieren kann, aber bezüglich Anfang und Ende der Moleküle nicht der in-vivo-RNS gleicht, oder

daß das Transkriptionsprodukt nur einem Teil der viralen Sequenzen komplementär ist.

Der Gehalt an RNS-Doppelsträngen zeigt an, daß bei der Transkription beide Stränge des DNS-Doppelstranges abgelesen werden. Dies ist bei der Transkription in vivo nicht der Fall (81). Für die Brauchbarkeit der c-RNS zum Nachweis viraler DNS sind diese Fragen nicht relevant, solange es um den Nachweis kompletter Genome geht, da man in diesem Fall den Test durch Rekonstitutionsexperimente eichen kann (siehe IV,7).

Eine mögliche Fehlerquelle ist in der Tatsache zu sehen, daß E. coli-Polymerase unter bestimmten Bedingungen zur un gelenkten Synthese von Polyadenylsäure neigt (11). In diesem Falle wäre nur noch ein Teil der gebildeten radioaktiven Nukleinsäure virus-spezifisch, ein andere wäre unter Umständen zur unspezifischen Bindung an A-T-reiche Sequenzen der DNS befähigt. Wir haben deshalb in die Transkriptionsreaktion nur unmarkiertes Adenosintriphosphat eingesetzt. Auf diese Weise kann zwar nicht die mögliche Bildung von Poly-A verhindert werden, wohl aber, daß seine Bindung im Hybridisierungsexperiment zu irreführenden Ergebnissen führt.

4. Differenzierung von Herpes-simplex-Stämmen aufgrund unvollständiger Kreuzhybridisierung der viralen DNS aus den Serotypen 1 und 2.

Für die Einteilung der Viren stehen heute in erster Linie morphologische und physikochemische Charakteristika zur Verfügung (115), einmal die Natur des genetischen Materials, ob Ribo- oder Desoxyribonukleinsäure, dann Größe und Symmetrie des Nukleokapsids sowie Zahl der Kapsomeren, aus denen es gebildet wird. Erst in neuerer Zeit gewinnen wir zunehmend Information über biologische Gegebenheiten der Viren, sodaß nun auch Ort und Mechanismus der viralen Replikation, Gehalt bestimmter Enzyme oder der für sie kodierenden Gene, Aktivierung und Hemmung der Synthese zellulärer Faktoren zur Charakterisierung von Viren und Virusgruppen herangezogen werden können. Wieweit diese Merkmale "echten", d.h. phylogenetischen Verwandtschaftsbeziehungen der Viren Rechnung tragen, wird zur Zeit noch diskutiert (79). Es ist zumindest denkbar, daß Viren, obgleich verschiedener Herkunft, aufgrund von Umweltbedingungen (Eigenarten des Wirtsorganismus z.B.) Ähnlichkeiten in ihrem morphologischen Aufbau wie auch in ihrem biologischen Verhalten herausgebildet, daß sie eine Art von konvergenter Evolution durchgemacht haben. Eine Möglichkeit, diese Frage zu studieren, besteht darin, daß man jene Bestandteile des Virus untersucht, die diesem Evolutionsdruck nur partiell unterliegen. Das ist einmal die Aminosäuresequenz der viralen Proteine, und in noch stärkerem Maße die Basensequenz seiner Nukleinsäure. Die gleiche Funktion und Form kann durch eine nahezu unbegrenzte Zahl von Proteinen

verschiedener Sequenz verwirklicht werden. Es ist deshalb nicht anzunehmen, daß sich die Entwicklung eines Proteins auf eine bestimmte Funktion hin in seiner Aminosäuresequenz widerspiegeln wird. Und erst recht wird sie wegen der Degeneration des genetischen Codes nicht in der Basensequenz der viralen Nukleinsäure ihren Ausdruck finden. Vorausgesetzt, daß nicht ganze Gene fremden Ursprungs aufgrund von Rekombinationsereignissen von viralen Genomen übernommen werden, dürfte die Evolution des genetischen Materials bezüglich seiner Basensequenz immer divergenter Natur sein. Ähnlichkeiten in der Basenzusammensetzung der Nukleinsäuren müssen dann Ausdruck phylogenetischer Verwandtschaft sein.

In der Tat werden in einigen virologischen Laboratorien derartige Untersuchungen durchgeführt. Im einfachsten Fall wird radioaktiv markierte virale DNS mit einem Überschuß unmarkierter DNS eines anderen Virus zur Reaktion gebracht und die relative, d.h. die auf das homologe System bezogene Bindungsrate bestimmt (50). Des weiteren kann man im Konkurrenzexperiment die Bindung DNS - ^3H -DNS im homologen System durch Zugabe steigender Mengen fremder, nicht markierter DNS zu hemmen suchen. Auf diese Weise ist gezeigt worden, daß die Serotypen 1 und 2 des Herpes-simplex-Virus eine Kreuzhybridisierung von 50 - 65 % aufweisen (50,81), die übrigen Herpesviren des Menschen untereinander aber nicht kreuzreagieren.

Die unvollständige Kreuzhybridisierung der Herpes-simplex-Typen 1 und 2 gibt uns die Möglichkeit, beide Typen aufgrund dieser Eigenschaft zu differenzieren. Da für die Reaktion kein infektiöses Virus erforderlich ist und der Test ohnehin in Gegenwart zellulärer DNS durchgeführt wird, eignet er sich auch

zur Typisierung von persistierenden Viren.

Das Verfahren besteht darin, daß gleiche DNS-Mengen des zu testenden Virus mit radioaktiv markierter Herpes-DNS vom Typ 1 und solcher vom Typ 2 inkubiert werden. Zugehörigkeit des unbekannten Virus zu einem der beiden Typen sollte sich durch erhöhte Bindungsraten gegenüber der entsprechenden ^3H -DNS dokumentieren.

Die Reaktionsbedingungen wurden im lytischen System ausgearbeitet. Permissive Zellen wurden mit Herpesviren infiziert und 1 - 2 Tage bei 37° inkubiert. In Anlehnung an die Beschränkungen, die im Falle eines persistierenden Virus gegeben sind, wurde die virale DNS zusammen mit der zellulären extrahiert, in steigenden Mengen auf Filtermembranen fixiert und mit markierter, hochgereinigter viraler DNS hybridisiert (Abb.9). Wir finden annähernd lineare Abhängigkeit der gebundenen Radioaktivität von der Menge der vorgegebenen DNS (viraler und zellulärer) im Bereich von 10 - 50 μg . In allen folgenden Experimenten wurden 45 μg zellulärer DNS vorgelegt.

In Abb. 10 wird die Abhängigkeit der gebundenen Radioaktivität von der Menge der eingesetzten, viralen, markierten DNS dargestellt. 45 μg DNS aus infizierten Zellen wurden mit steigenden Mengen viraler ^3H -DNS inkubiert. Über den gesamten getesteten Bereich wird keine Sättigung der vorgelegten unmarkierten DNS erreicht, und die gebundene Radioaktivität ist annähernd proportional der zugegebenen. Es ist deshalb erlaubt, bei unterschiedlichen Mengen zugegebener viraler DNS die Menge der gebundenen Radioaktivität von einem Eingabewert auf einen anderen umzurechnen,

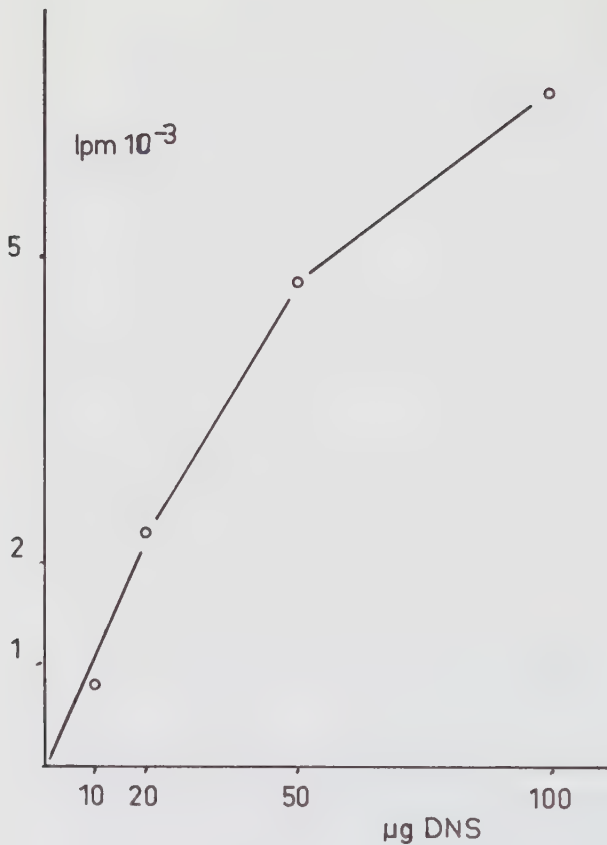


Abb. 9 : Abhängigkeit der gebundenen Radioaktivität von der Menge der vorgelegten DNS aus infizierten Zellen im DNS-DNS-Hybridisierungsexperiment. Steigende Mengen zellulärer DNS wurden mit 1.4×10^4 Ipm HSV-1 DNS (spez. Aktivität 5×10^4 Ipm/ μg) inkubiert.

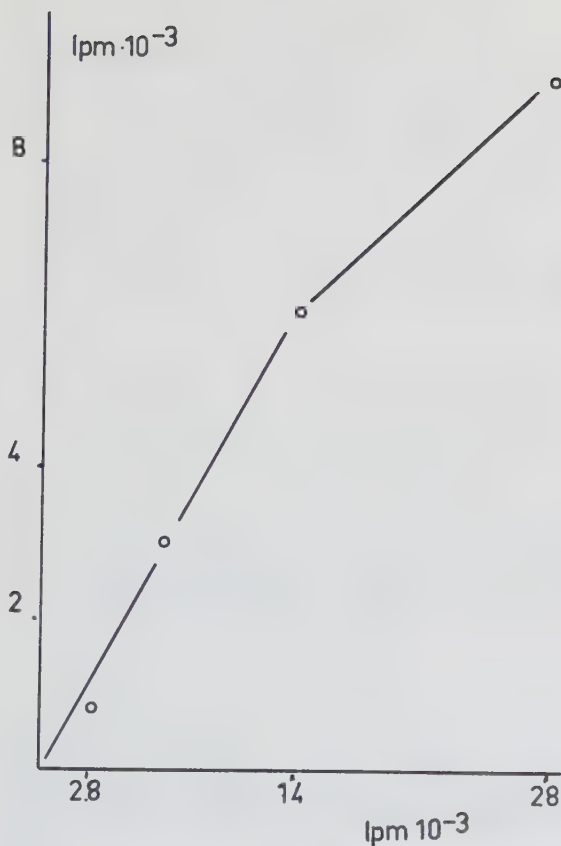


Abb. 10 : Abhängigkeit der gebundenen Radioaktivität von der Menge der eingesetzten radioaktiv markierten viralen DNS. 45 μ g DNS aus infizierten Zellen wurden mit steigenden Mengen markierter viraler DNS (spez. Aktivität 5×10^4 Ipm/ μ g) inkubiert.

DNS aus Vero- zellen infiz. mit	hybridisiert mit markierter DNS aus			
	Thea (HSV-1)		Haase (HSV-2)	
	Ipm geb.	% d. Eingabe	Ipm geb.	% d. Eing.
Thea (HSV-1)	1366	18.7	801	8.5
Haase (HSV-2)	994	13.6	2417	25.6
MS (HSV-2)	628	8.6	1478	15.8
US (HSV-2)	144	2.0	707	7.5
L-2 (HSV-1)	875	12.0	447	4.8
VR-3 (HSV-1)	1062	14.5	752	8.0
Hof (HSV-1)	1114	15.3	619	6.6
Bü.	3011	41.2	1964	20.9
vZ	602	8.3	387	4.1

Tab 4 : Hybridisierung der DNS aus HSV-infizierten Zellen mit markierter DNS von HSV-1 und HSV-2. 45 ug DNS aus infizierten Zellen wurden mit markierter DNS von HSV-1 (Stamm Thea, Eingabe 7.3×10^3 Ipm) und HSV-2 (Stamm Haase, Eingabe 9.4×10^3 Ipm) in 1.2 ml 3 x SSC, 0.04 % RSA, 0.1 % SDS bei 61° über 21 Std. hybridisiert.

desgleichen auch bei unterschiedlicher spezifischer Radioaktivität der verwendeten viralen DNS.

In einem ersten Experiment wurde je eine Rouxflasche mit Verozellen mit HSV-1 (Stamm Thea) und mit HSV-2 (Stamm Haase) infiziert. Am zweiten Tag p.i. wurden die Zellen geerntet; ihre DNS wurde extrahiert, denaturiert und auf je vier Nitrozellulosemembranen, wie unter III,14 beschrieben, fixiert.

Die fixierte DNS wurde mit radioaktiv markierter DNS aus den Virusstämmen "Thea" und "Haase" kreuzweise hybridisiert. HSV-1-DNS hatte eine spezifische Radioaktivität von 5.0×10^4 Ipm/ μ g, HSV-2-DNS eine solche von 3.8×10^4 Ipm/ μ g. Die höchste Bindungsrate wurde bei der Hybridisierung von DNS mit solcher des homologen Virus gefunden (^3H -DNS von "Thea" mit DNS aus "Thea"-infizierten Zellen 18.7 %, ^3H -DNS aus "Haase" mit DNS aus "Haase"-infizierten Zellen 25.6 %). Radioaktiv markierte DNS eines Virus, das nicht dem gleichen Serotyp angehört, erreichte nur etwa halb so hohe Hybridisierungsraten (8.5 % bzw. 13.6 %).

In der gleichen Weise wurden fünf weitere serologisch typisierte Virusstämmen getestet, indem DNS aus mit diesen Stämmen infizierten Zellen in die Hybridisierungsreaktion eingesetzt wurde (Tab. 4). In jedem Falle dokumentierte sich die Zugehörigkeit zum gleichen Serotyp wie das Testvirus (aus dem die radioaktiv markierte DNS gewonnen war) durch eine erhöhte Hybridisierungsrate, verglichen mit der eines typfremden Herpes-simplex-Virus.

Natürlich können nur solche Werte verglichen werden, die sich auf das gleiche DNS-Präparat aus infizierten Zellen beziehen, in Tab. 4 also nur solche einer horizontalen Zeile. Bedingt durch unterschiedliches Wachstumsverhalten der Virusstämmen sowie Ernte der infizierten Zellen zu unterschiedlichen Zeiten p.i. enthalten die zellulären DNS-Präparate unterschiedliche Mengen viraler DNS. Dies spielt aber so lange keine Rolle, als die DNS beider Virustypen mit einer zwar unbekannten, in beiden Fällen aber gleichen Menge viraler DNS hybridisiert wird.

Desgleichen wurden zwei weitere Virusstämme unbekannter Serotypie getestet. "Bü" wurde von Herrn Dr. V. ter Meulen, Würzburg, aus dem Liquor eines an einer Enzephalitis verstorbenen zehnjährigen Mädchens isoliert. Aufgrund seines Wachstumsverhaltens in Verozellen und eines positiven Immunfluoreszenztestes wurde das Virus als Herpes-simplex-Virus diagnostiziert. Die hohe Hybridisierungsrate mit HSV-1-DNS bestätigt dieses Ergebnis und erlaubt darüberhinaus die Einordnung des Virus in den Serotyp 1. Das gleiche gilt für den Stamm "vZ", einen Laborstamm unbekannter Herkunft.

In weiteren Experimenten wurde gezeigt, daß auch mit der DNS aus anderen HSV-Stämmen als "Haase" und "Thea" die Differenzierung zu testender HSV-Stämme möglich ist. Von den Stämmen "vR-3" (Serotyp 1) und "vZ" sowie "US" (Serotyp 2) wurde ebenfalls radioaktiv markierte, hochgereinigte DNS gewonnen. Mit diesen Präparaten und HSV-DNS "Haase" wurden die in Tab. 5 aufgeführten HSV-Stämme getestet und einem der beiden Serotypen zugeordnet. In keinem Falle wurde eine Diskrepanz zwischen der Einordnung nach den Kriterien des Hybridisierungstestes und denen der serologischen Typisierung beobachtet. Die serologische Typisierung hat freundlicherweise Herr Professor Schneweis, Bonn, durchgeführt.

In Tab. 6 sind vier weitere Virusisolate nach ihrem Verhalten in der Hybridisierungsreaktion typisiert worden. Die Stämme "VE-1" und "VE-2" wurden von Herrn Dr. Sonderkamp, Venlo, zur Diagnostizierung eingesandt. "VE-1" wurde aus der Leber eines am 11. Tag nach der Geburt verstorbenen Kindes isoliert. Die Leber zeigte herpestypische Veränderungen. Bei

DNS aus Vero- zellen infiz. mit	hybridisiert mit markierter DNS aus			
	VR-3 (HSV-1)		US (HSV-2)	
	Eing. 2.3×10^4 Ipm		Eing. 2.7×10^4 Ipm	
	Ipm geb.	% d. Eing.	Ipm geb.	% d. Eing.
VR-3 (HSV-1)	7563	32.9	4332	16.0
US (HSV-2)	595	2.6	1280	4.7
L-2 (HSV-1)	7708	33.6	5510	20.4
Hof (HSV-1)	3954	17.2	1778	6.6
Haase (HSV-2)	1904	8.3	4478	16.6
Bü (Isolat)	9157	39.8	4706	17.4

	vR-3 (HSV-1)		Haase (HSV-2)	
	Eing. 1.4×10^4 Ipm		Eing. 1.7×10^4 Ipm	
Thea (HSV-1)	5408	38.7	2011	11.8
US (HSV-2)	1312	9.4	3345	19.7
Scholl (HSV-2)	3083	22.0	6133	36.1
Klee (HSV-2)	3629	25.9	8105	47.1
Albert (HSV-2)	971	6.9	2666	15.7
Gerling (HSV-2)	2695	19.3	6989	41.0

Tab. 5 : Hybridisierung von DNS aus infizierten Zellen mit gereinigter HSV-1- und HSV-2-DNS. Reaktionsbedingungen siehe Legende zu Tab. 4.

"VE-2" handelt es sich möglicherweise um einen genitalen Herpesstamm, der im Hybridisierungstest jedoch eindeutig Herpes simplex Typ 1 ist. "ER-1" wurde in der Universitätskinderklinik Erlangen aus einer Hautläsion eines 17 Monate alten Kindes (G.B. 19.5.71)

isoliert. "ER-2" stammt aus dem Liquor eines Enzephalitispatienten.

Alle getesteten Stämme müssen nach ihrem Verhalten im Hybridisierungstest dem Serotyp 1 zugeordnet werden. Die serologische Untersuchung wird von Herrn Prof. Schneeweis, Bonn, durchgeführt; die Ergebnisse stehen noch aus.

Die Methode hat sich ausgezeichnet zur routinemäßigen Differenzierung von Herpes-simplex-Isolaten bewährt. Das aus Liquor oder Hautläsionen isolierte Virus wird auf Verozellen angezüchtet. In günstigen

DNS aus Verozellen infiz. mit	hybridisiert mit markierter DNS aus			
	VR-3 (HSV-1) Eing. 1.4×10^4 Ipm		Haase (HSV-2) Eing. 1.7×10^4 Ipm	
	Ipm geb.	% d.Eing.	Ipm geb.	% d.Eing.
Thea (HSV-1)	5408	38.7	2011	11.8
US (HSV-2)	1312	9.4	3345	19.7
VE-1	12193	82.1	5421	31.9
VE-2	9361	66.9	3975	25.1
ER-2	12593	90.0	7222	42.5

	vZ (HSV-1) Eing. 2.4×10^4 Ipm		US (HSV-2) Eing. 2.4×10^4 Ipm	
MS (HSV-2)	1607	6.7	5061	21.1
Thea (HSV-1)	5383	22.4	2512	10.5
ER-1	8401	35.0	4740	19.7

Tab.6 : DNS-DNS-Hybridisierung zur Typisierung von Herpes-simplex-Virusisolaten. Reaktionsbedingungen siehe Legende zu Tab. 4.

Fällen kann die DNS bereits am folgenden Tag extrahiert und auf die Filter aufgebracht werden. Am übernächsten Tag können dann die Ergebnisse vorliegen. Der aufwendigste und, was Laborerfahrung und -geschicklichkeit betrifft, anspruchsvollste Schritt des ganzen Verfahrens ist die Präparation markierter viraler DNS. Die Qualität des Präparats ist aber leicht zu testen, und im Tiefkühlfach eingefroren, ist die virale DNS über lange Zeit lagerfähig. Die Gewebekultur gehört in vielen virologisch-diagnostischen Laboratorien zur Routinearbeit. Die Extraktion und quantitative Bestimmung der DNS ist problemlos. Bei genügend standardisiertem Extraktionsverfahren kann die Bestimmung des DNS-Gehaltes fortfallen, da die Menge der aufgetragenen zellulären DNS in weiten Grenzen variieren kann.

Zur genauen Bestimmung der Basenhomologie zweier DNS-Proben nach diesem Verfahren müßte man die Menge der vorgelegten DNS aus infizierten Zellen soweit steigern, daß eine Sättigung der zugegebenen markierten DNS erreicht wird, oder die Zugabe markierter DNS entsprechend verringern. Im ersten Fall würde man auf Schwierigkeiten stoßen, weil die Kapazität der Filter nicht unbegrenzt ist und besonders bei schlecht wachsenden Viren die zelluläre DNS nur wenig virale DNS enthält. Aussichtsreich scheint das zweite Verfahren zu sein, insbesondere wenn noch höher markierte virale Nukleinsäure zur Verfügung steht. Wir versuchen deshalb, statt der viralen DNS hochmarkierte, in vitro synthetisierte c-RNS einzusetzen. Diese Versuche befinden sich noch im Anfangsstadium. Sie verlangen vor allem den Nachweis, daß das Transkriptionsprodukt tatsächlich das gesamte virale Genom qualitativ und quantitativ repräsentiert.

5. Versuche zur Etablierung einer persistierenden Infektion mit HSV in menschlichen Zellen.

Herpes-simplex-Viren zeichnen sich nicht nur durch eine ausgesprochene Neurovirulenz aus (1,45,60), allem Anschein nach sind Nervenzellen auch der Ort, an dem das Virus persistieren kann (70,72). So wurde gezeigt, daß Mäuse, die eine Herpesinfektion überstanden hatten, das Virus in den spinalen Ganglien (102), Kaninchen mit einer rekurrenten Herpesinfektion der Augen das Virus in den trigeminalen Ganglien beherbergen können (103). Wesentliche Voraussetzung für diesen Vorgang scheint zu sein, daß die Zelle auf eine bisher unbekannte Weise die Replikation des Virus verhindert. Explantation der Zellen in die Gewebekultur ist mit der Aufhebung dieses wie auch immer gearteten Blocks verbunden. Das Virus kann nun vermehrt und entweder im Überstand der Zellen (102) oder durch Übertragung aus den aufgebrochenen Nervenzellen auf permissive Zellen nachgewiesen werden (103). Die "Repression" des Virus scheint demnach eine Fähigkeit einzelner Zellarten zu sein, während das Vermögen, ein Herpesvirus prinzipiell aufzunehmen und sein DNS zu beherbergen, weit unspezifischer auch anderen Zellen eigen zu sein scheint, wegen der der Infektion in den meisten Fällen folgenden Zellyse jedoch in der Regel nicht beobachtet werden kann. Man hat aber gezeigt, daß nach Infektion mit UV-bestrahltem Virus virale Funktionen in der Zelle persistieren. So haben Munyon u.a. (58) durch Infektion mit tödlich bestrahltem Herpesvirus Typ 2 eine virusspezifische Thymidinkinase in genetisch stabiler Form in eine Kinase-lose Mutante von Mäusezellen einführen können. Die Transformation von embryona-

len Hamsterfibroblasten mit UV-bestrahltem HSV Typ2 (18) spricht nach den heutigen Vorstellungen von der virusinduzierten Onkogenese ebenfalls für die Persistenz des viralen Genoms, oder doch eines Teiles davon, in den Zellen, zumindest dann, wenn tatsächlich die Transformation unmittelbar durch das Virus bewirkt wurde. Und schließlich ist aus Tumorzellen des menschlichen Cervix-Karzinoms ein Herpes-simplex-Virus Typ 2 durch Explantation der Zellen in die Gewebekultur reaktiviert worden. (5).

Soweit bei diesen Experimenten Infektionen von Zellen beteiligt waren, wurden diese mit UV-bestrahltem Virus durchgeführt, um die virale Replikation und die damit verbundene Lyse der beteiligten Zellen zu verhindern. Eine andere Möglichkeit bestünde darin, Herpes-simplex-resistente Zelllinien zu verwenden. Allerdings zeigen diese Viren gegenüber Zellen in der Gewebekultur ein ungewöhnlich breites Wirtsspektrum. Infizierte Zellen weisen oft schon nach wenigen Stunden cytopathische Veränderungen auf und gehen innerhalb von 24 Stunden zugrunde. Resistente Linien sind kaum bekannt. Roizman beschreibt eine gegenüber einer Virusmutante resistente Hundezelllinie (3), doch verläuft die Infektion in diesem Falle abortiv, da die Resistenz auf Interferoninduktion beruht (4).

Bei Versuchen, in menschlichen lymphoblastoiden Zelllinien das persistierende Epstein-Barr-Virus durch eine Überinfektion mit Herpes-simplex-Virus zu reaktivieren, fanden Henle und Mitarb. 1969 (38), daß eine dieser Linien, Kudi, nach einer Infektion mit Herpes simplex nicht zugrunde ging. Deshalb wurde geplant, in dieser und möglicherweise noch weiteren Linien lymphoblastoider Zellen die Resistenz näher

zu untersuchen, insbesondere zu prüfen, ob alle Infektionsschritte normal verlaufen, und schließlich, ob in der überlebenden Kultur das virale Genom persistiert.

Untersucht wurden zwei Burkitt- (2002 und 2003), zwei Mononukleose- (Kaplan und Elaine) und eine Gibbonlinie, die durch Cokultivierung primärer

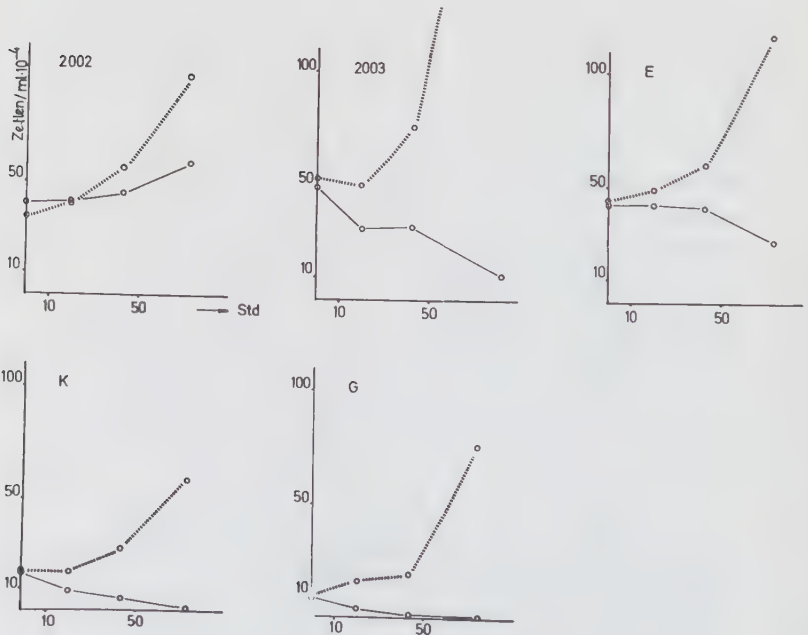


Abb. 11 : Infektion der lymphoblastoiden Zelllinien 2002, 2003, Elaine (E), Kaplan (K), und Gibbon Nr. 10 (G) mit einer PbE/Zelle des HSV-2, Stamm Haase. Die ausgezogene Linie zeigt die Zellzahl der infizierten Kultur nach den angegebenen Zeiten, die gestrichelte Linie die Zellzahl des entsprechenden Kontrollanstzes.

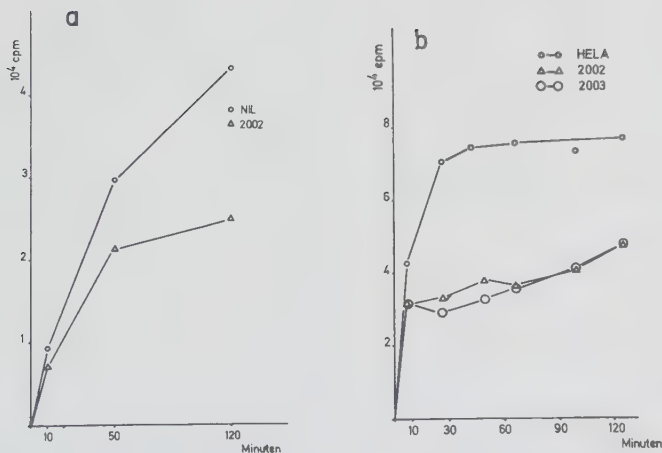


Abb. 12 : Adsorption von HSV-2 an Zellen der Linien 2002, 2003, Hela und Nil-2 (syrischer Hamster).

1×10^7 Zellen wurden in 1.0 ml serumfreiem Medium mit 1×10^5 ipm radioaktiv markiertem Virus bei a) Raumtemperatur und b) 37° inkubiert. Die Ordinate gibt den Verlust an Radioaktivität aus dem Kulturüberstand an.

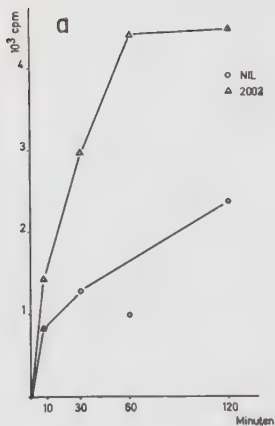


Abb.13

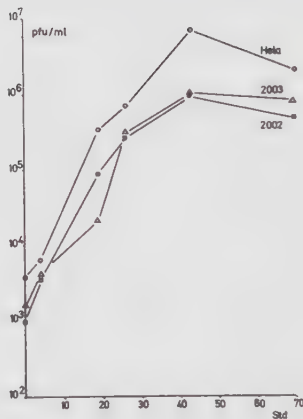


Abb14

Abb. 13 : Elution radioaktiven Materials zweistündiger Adsorption von 1×10^5 Ipm thymidinmarkierten HSV-2 an 1×10^7 Zellen, dreimaligem Waschen mit MEM. Die Ordinate zeigt das Auftreten von Radioaktivität im Kulturüberstand zu verschiedenen Zeiten nach dem Waschvorgang.

Abb. 14 : Synthese von infektiösem Virus HSV-2 in den Zellen 2002, 2003, Hela. Die Ordinate gibt den Gehalt an infektiösem Virus in PbE/ml des Kulturüberstandes mit zunehmender Zeit p.i. an. Infektionsmultiplizität war 1 PbE/Zelle.

Gibbonleukozyten mit EBV-produzierenden Zellen erhalten worden war. Mit Ausnahme der 2002-Linie nimmt die Zellzahl bei allen anderen getesteten Zellstämmen nach Infektion mit HSV-2 (Infektionsmultiplizität: eine PbE/Zelle) ab (Abb.11). Der Versuch wurde beendet, als die nichtinfizierten Kontrollkulturen reif zur Teilung waren.

Im Falle der Linie 2002 steigt die Zellzahl nach der Infektion zwar weiterhin an, doch bleibt sie deutlich hinter der der Kontrolle zurück. Die Adsorption des Virus an diese und andere Zellen wurde bei Raumtemperatur mit ^3H -Thymidin-markiertem Virus gemessen. 1×10^7 Zellen wurden in 1.0 ml serumfreiem Medium MEM mit 1×10^5 Ipm. radioaktivem Virus auf der Schüttelmaschine mäßig bewegt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden 100 μl - Proben entnommen und bei 1000 Upm für 7' zentrifugiert. 50 μl vom Überstand wurden vermessen. Die Adsorption wurde aus der Differenz zur Radioaktivität zum Zeitpunkt Null berechnet.

Die Zellen der Linien 2002 und 2003 zeigen kein unterschiedliches Verhalten hinsichtlich der Adsorption von HSV-2 (Abb.12), doch adsorbieren beide deutlich schlechter (etwa 30 %) als Hela- oder Nilzellen.

Zudem ist die Elution radioaktiven Materials nach zweistündiger Adsorption im Falle der 2002-Zellen etwa doppelt so stark wie bei den Nil-2 - Zellen. Danach scheint die Adsorption und eventuell auch die Penetration des Virus in die 2002-Zellen weniger glatt vonstatten zu gehen als bei anderen Zellen. Die Elution wurde nach dreimaligem Waschen der Zellen in MEM als die in Abhängigkeit von der Zeit im Kulturmedium auftretende Radioaktivität bestimmt (Abb.13).

Dennoch findet auch in den 2002-Zellen Synthese von infektiösem Virus statt. In Abb. 14 ist die Infektiosität in PbE/ml einiger Zellüberstände gegen die Zeit nach der Infektion aufgetragen.

Die virale DNS-Synthese in den infizierten Zellen wurde mittels der in-situ-Hybridisierungsreaktion verfolgt (44,69,122), bei der infizierte Zellen zu verschiedenen Zeiten nach der Infektion auf Objektträgern fixiert wurden (siehe III,17). Ihre DNS wurde mit Alkali denaturiert und mit virusspezifischer markierter c-RNS inkubiert. Die nichtgebundene RNS wurde abgedaut und ausgewaschen, die gebundene mittels einer Autoradiographie dargestellt. Die Methode wurde zunächst an Helazellen erprobt. (Abb. 15). Man erkennt deutlich HSV-DNS-synthetisierende Zellkerne an ihrer granulierten Schwärzung. Sie nehmen mit zunehmender Zeit nach der Infektion an Zahl und Schwärzungsgrad zu. Bereits 2.5 Std. p.i. (Abb.15,B) treten die ersten Virus-DNS-synthetisierenden Kerne auf, was gut mit den Daten anderer Autoren übereinstimmt, die den Beginn der viralen DNS-Synthese durch Inkorporation von ^3H -Thymidin drei Stunden nach der Infektion feststellen konnten (78). Die Zahl der synthetisierenden Zellen ist erwartungsgemäß nicht ganz eindeutig, da alle Übergänge von nichtmarkierten zu starkmarkierten Kernen vorkommen. Doch scheint die DNS-Synthese, einmal angelaufen, rasch vonstatten zu gehen, sodaß immer nur bei einem geringen Prozentsatz der Zellen Zweifel über deren Zugehörigkeit zu "negativ" oder "positiv" bestehen.

Unter den infizierten Zellen der 2002-Kulturen finden sich ebenfalls solche, die deutlich virale DNS synthetisieren, allerdings in geringerer Zahl als bei den Hela-Zellen (Abb.16).

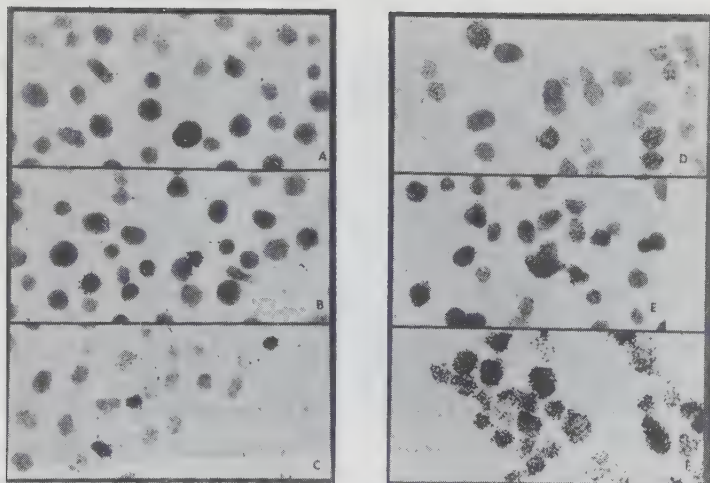


Abb. 15 : In-situ-Hybridisierung infizierter Hela-
zellen mit HSV-cRNS. Infizierte Zellen wurden 2.5 (B),
3.3 (C), 6.8 (D), 13.5 (E) und 22 Std. (F) p.i. auf
Objektträgern fixiert, ihre DNS denaturiert, mit cRNS
hybridisiert, autoradiographiert und nach Giemsa ge-
färbt wie unter III,17 beschrieben. (A) ist eine
nichtinfizierte Kontrollkultur.

Nach der Infektion vermehrten sich die 2002-Zel-
len für die nächsten zehn Passagen sehr langsam. Die
Kultur konnte nur durch häufiges Waschen der Zellen
und Mediumwechsel vor dem Absterben bewahrt werden.
In der vierten Passage wurde fünf Tage nach Ersatz
des Nährmediums die Infektiosität im Zellüberstand
gemessen:

$$1.6 \times 10^5 \text{ PbE/ml}$$

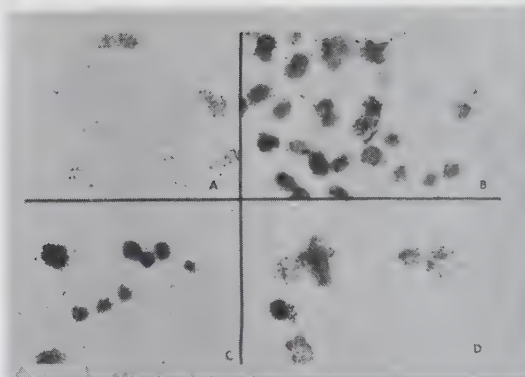


Abb. 16 : In-situ-Hybridisierung infizierter 2002-Zellen mit HSV-cRNS. Infizierte Zellen wurden 1 (A), 3.5 (B), 13.5 (C) und 23 Std. p.i. auf Objektträgern fixiert und mit HSV-cRNS hybridisiert (siehe III,17).

Von der 10. Passage ab gewannen die Zellen ihr ursprüngliches Aussehen zurück, und die Zellzahl nahm rasch zu. In der 13. Passage wurde die Infektiosität im Überstand erneut bestimmt:

$$2.5 \times 10^4 \text{ PbE/ml}$$

Eine Infektion mit HSV in der 15. Passage überstand die Kultur ohne sichtbaren Effekt. In der 27. Passage wurde ein hoher Anteil an Zellbruchstücken beobachtet. Fünf Tage später fanden sich keine lebenden Zellen mehr in der Kultur.

Ein erneuter Versuch endete in der 19. Passage mit dem Absterben der Kultur.

Charakteristisch für latente Herpesinfektionen höherer Organismen einschließlich des Menschen ist, daß in den Zeiten zwischen dem rekurrenten Auftreten der viralen Infektion im Gewebe keine infektiösen Viruspartikel nachgewiesen werden können (70,77). Das Virus ist in einer nichtinfektiösen Form "untergetaucht". Einen solchen Zustand hat das getestete Virus in der Kultur der 2002-Zellen nicht angenommen. In der 4. wie in der 13. Passage wurde ein wenn auch niedriger Virustiter festgestellt. Es ist deshalb fraglich, ob das System überhaupt wesentliche Ähnlichkeiten mit einer latenten Infektion aufweist. Eher scheint es einer abortiven Infektion von Zellen zu gleichen, die wegen mangelnder Produktion das Virus schließlich verlieren. Daß die Infektion dann doch mit dem Absterben der Kultur endete, könnte an leicht veränderten Bedingungen der Zellhaltung oder des Mediums liegen, durch die möglicherweise die Virusproduktion angeregt wurde, oder daran, daß eine Virusmutante mit verbessertem Replikationsverhalten in 2002-Zellen entstand. Im letzteren Falle wäre unschwer einzusehen, warum die Überinfektion in der 15. Passage ohne Effekt auf die Zellen blieb.

Unsere Beobachtungen stehen im Einklang mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (40,77,83,105). Auch sie fanden in permanent infizierten Kulturen infektiöses Virus im Kulturmedium oder auch in den Zellen. O'Neill u.a. (68) konnten die Herpesvirus-Replikation in menschlichen Gewebekulturzellen durch Cytosin-arabinosid hemmen. Erst 5 - 6 Tage nach Abnahme des Inhibitors begann in einigen Zellen die Virusvermehrung. Es ist jedoch auch hier unklar, ob diese Beobachtungen überhaupt auf Analogien zu einer latenten Herpesinfektion beruhen.

6. Infektion menschlicher Leukozyten und embryona-
ler Fibroblasten mit UV-inaktiviertem HSV-2.

Im Gegensatz zur "Repression" der viralen Replikation scheint die Persistenz viraler DNS in der Zelle weit weniger zellspezifisch zu sein (5,18,58). Es müßte deshalb möglich sein, durch Infektion mit UV-bestrahltem Virus virale DNS auch in menschliche Zellen einzuschleusen und sie dann mittels der Nukleinsäurehybridisierung dort als ständiger Bestandteil der nukleären DNS nachzuweisen. Vorbedingung war, daß es gelingen würde, Zellen, die virale DNS in genetisch stabiler Weise enthalten, aus der übrigen Zellpopulation herauszuselektionieren. Diese Möglichkeit schien gegeben, als Duff und Rapp (18) die Transformation embryonaler Hamsterfibroblasten mittels UV-bestrahltem HSV-2 zeigen konnten. Transformierte Zellen sind potentiell unsterblich und sollten nicht wie primäre Zellen nach einer Anzahl von Passagen zugrunde gehen. Wir haben deshalb die Infektion mit bestrahltem HSV-2 an primären menschlichen Zellen vorgenommen in der Hoffnung, daß ein Teil der Zellen transformiert würde und ihre Clone dann die übrige Population überwuchern würden.

Dazu mußte zunächst eine UV-Inaktivierungskinetik aufgestellt werden. 5.0 ml Überstand einer 40 Std. zuvor infizierten Nil-Zellkultur wurden in einer Plastikpetrischale von 6 cm Durchmesser unter Rühren mit UV-Licht (Thomas-UV-Lampe, Abstand der Strahlungsquelle 20 cm) bestrahlt. Zu verschiedenen Zeiten wurden 0.1 ml-Proben gezogen, deren Infektiosität im Plaquetest bestimmt wurde (Abb. 17). Nach acht Minuten betrug die Infektiosität weniger als 1 PbE/ml.

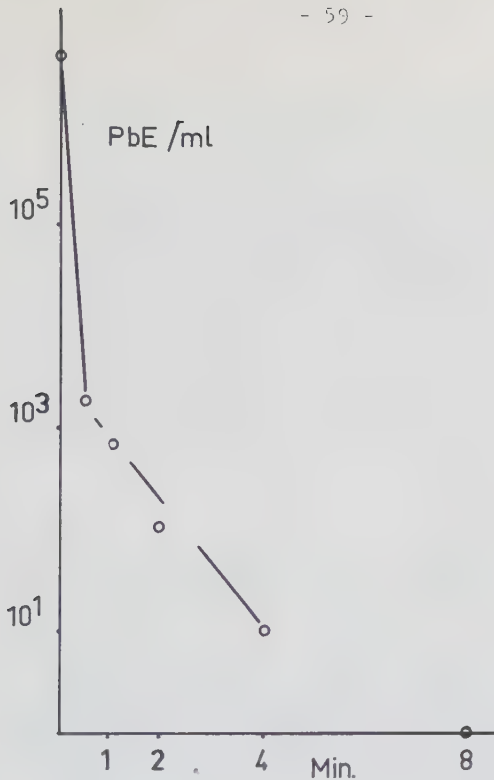


Abb. 17 : Inaktivierung von HSV-2, Stamm Haase, mit teils UV-Licht. Das Virus wurde in einem Volumen von 5.0 ml in einer Petrischale von 6 cm $\varnothing$ mit einer Thomas-UV-Lampe aus einer Entfernung von 20 cm bestrahlt. Auf der Abszisse ist die Zeit der Bestrahlung, auf der Ordinate die Infektiosität der Virus-suspension abgetragen.

b. Infektion primärer Leukozyten. Im Infektions-experiment wurden 20 ml Venenblut eines erwachsenen männlichen Spenders mit drei Tropfen Heparinlösung und vier ml Dextran für drei Stunden in der aufrecht stehenden Spritze belassen. Serum und "buffy coat" wurden abgedrückt und mit 20 ml Nährmedium 1640 ge-

waschen und mit 20 ml desselben Mediums, das 15 % fötales Rinderserum und 5 % menschliches Serum enthielt, aufgenommen. Der Zellsuspension wurden 30 μ l Phytohämagglutinin P zugegeben. Nach dreitägiger Inkubation bei 34° wurde die Suspension in zwei Teile geteilt, von denen der eine mit 2.0 ml einer UV-bestrahlten HSV-2-Suspension (10' Bestrahlungsdauer unter den Bedingungen des Inaktivierungsexperimentes, Seite 58) infiziert wurde. Beide Kulturen wurden bei 36° inkubiert. Alle drei Tage wurden zwei Milliliter ihres Mediums ersetzt. Am 15. Tag wurden beide Kulturen aufgegeben, da sie keine lebenden Zellen mehr enthielten.

c. Infektion embryonaler menschlicher Fibroblasten.

Zehn Plastikpetrischalen, 6 cm im Durchmesser, mit confluenten Kulturen menschlicher embryonaler Lungenfibroblasten (HEL-Zellen) wurden mit je 1.0 ml einer UV-inaktivierten HSV-2-Suspension (Stamm Haase, Bestrahlungsdauer 8', übrige Bedingungen wie im Inaktivierungsexperiment auf Seite 58 beschrieben) versetzt, 1 Std. unter häufigem Schwenken im CO₂-Inkubator bei 36° belassen, mit Nährmedium MEM gewaschen und mit je 6 ml MEM, das 15 % fötales Rinderserum und 5 % menschliches Serum enthielt, überschichtet. Die Kulturen wurden bei Confluenz (alle drei bis vier Tage) trypsiniert und erneut ausgesät. Sie zeigten gegenüber uninfizierten Kulturen keine Veränderung.

Etwa ab der 20. bis 25. Passage (unterschiedlich in den einzelnen Petrischalen) verminderten die Zellen deutlich ihre Teilungsrate, verloren ihr typisches fibroblastenähnliches Aussehen durch beträchtliche Zunahme ihrer Breitenausdehnung. Die Kulturen konnten mangels ausreichender Zellzahlen nicht mehr

DNS aus	Ipm geb.	% der Eing.
menschlichen Leukozyten	188	1.1
HSV-2-infiz. Verozellen	3533	20.8
HEL - HSV	131	0.8

Tab. 7: Hybridisierung von DNS aus einer mit inaktiviertem HSV-2 infizierten Kultur menschlicher Fibroblasten (HEL-HSV) mit markierter DNS aus HSV-2.

geteilt erden, wurden aber weiterhin zweimal die Woche gefüttert.

In der 20. Passage wurden alle bei der Teilung der Kulturen übriggebliebenen Zellen gesammelt, ihre DNS wurde extrahiert und mit HSV-2-DNS hybridisiert (Tab.7). In der zellulären DNS konnte keine virale DNS mehr nachgewiesen werden. Drei Wochen später enthielten die Kulturen keine lebenden Zellen mehr, und der Versuch wurde abgebrochen.

Die offensichtliche Degeneration und schließlich der Tod der Zellkultur deuten daraufhin, daß keine Transformation der menschlichen Zellen stattgefunden hat. Ein positiver Nachweis von viraler DNS in den Zellen konnte unter diesen Umständen nicht erwartet werden, da, bedingt durch die ausbleibende Transformation, auch keine Selektion auf solche Zellen stattfand, die virale DNS hätten enthalten können.

Da es bis vor kurzem noch nicht möglich war, eine latente Herpes-simplex-Infektion in Zellkulturen zu

etablieren - vor kurzem berichtet Munkx (57) über erfolgreiche Versuche in dieser Richtung - , werden in einigen Laboratorien Organkulturen, bevorzugt Gewebe des zentralen und peripheren Nervengewebes, für derartige Versuche benutzt (24). Man hofft, daß im organisierten Zellverband jene Funktionen erhalten bleiben, die zur Unterdrückung der viralen Replikation nötig sind. Allerdings ist die Lebensdauer von Organkulturen begrenzt, und Langzeitexperimente finden hier ihre Limitation.

7. Versuche zum Nachweis von Herpes-simplex-Typ 2-DNS in Biopsien menschlicher Cervix-Karzinome.

Ein weiteres Gewebe, das möglicherweise ein latentes Herpesvirus enthält, ist der menschliche Cervix-Tumor. Seit etwa acht Jahren sammeln sich Verdachtsmomente, die auf eine Herpesvirus-bedingte Entstehung dieser Geschwulst deuten. Naib u.a. (64) berichteten 1966, daß Frauen mit herpesbedingten Läsionen der Cervix besonders häufig an einem Cervix-Karzinom erkranken. Umgekehrt haben serologische Untersuchungen in mehreren Laboratorien gezeigt, daß bei Frauen mit einem Cervix-Karzinom weit häufiger als bei solchen aus Kontrollgruppen Antikörper gegen HSV-2 gefunden werden (61,63,65,76). Der hierauf begründete Verdacht eines kausalen Zusammenhanges zwischen dem HSV-2 und dem menschlichen Cervix-Karzinom war Anlaß zu zahlreichen Experimenten, die die onkogene und zelltransformierende Natur dieses Herpesvirus nachweisen sollten.

Infektionsversuche am lebenden Tier (61,62) brachten keine eindeutigen Aussagen. Mäuse, Hamster und Cebusaffen, deren Genitalien mit HSV-2 infiziert wurden, starben zu über 90 %. Noch höhere Mortali-

tät zeigten neugeborene Hamster und Mäuse, in die man das Virus injizierte (62). In einigen der überlebenden Tiere fand man Chondro-Sarkome sowie andere Sarkome, deren Zellen in der Gewebekultur auswuchsen und die sich auf andere Tiere der gleichen Spezies übertragen ließen. In den tumortragenden Tieren konnten aber keine Antikörper gegen Herpes simplex nachgewiesen werden. Dagegen wurden in einigen Tumoren elektronenoptisch C-Typ-Partikel beobachtet, sodaß die Aktivierung eines RNS-Tumovirus nicht ausgeschlossen ist.

Erfolgreicher war der Versuch, primäre Zellen mit dem Virus zu transformieren. Duff und Rapp (18,19) inkubierten embryonale Hamsterzellen mit UV-bestrahltem Herpesvirus und fanden Foci von transformierten Zellen, die sich aussäen ließen und die, in neugeborene Hamster injiziert, dort invasive Tumore hervorriefen. Die Tiere zeigten Serokonversion gegenüber HSV-2, und in den Tumorzellen konnten herpesspezifische Antigene, nicht dagegen solche von RNS-Tumoviren, nachgewiesen werden (74). Daß es Munk (57) inzwischen gelungen ist, auch menschliche Zellen zu transformieren, wurde schon an anderer Stelle erwähnt.

In den explantierten Tumorzellen des menschlichen Cervix-Karzinoms haben Royston und Aurelian (85) mittels der Immunfluoreszenz Herpesvirus-Antigene dargestellt. Die spontane Reaktivierung eines Herpesvirus in Zellkulturen von Cervix-Karzinomen ist ebenfalls beobachtet worden (5).

Es wäre sicher verfrüht, in diesen Befunden einen Beweis für die herpesbedingte Pathogenese des cervicalen Tumors zu sehen, der Verdacht jedoch eines kausalen Zusammenhanges scheint wohlbegründet. Sollte er den Tatsachen entsprechen, dann müßte nach den

heutigen Vorstellungen über die virusbedingte Onkogenese und in Analogie zu allen anderen virusinduzierten Neoplasmen, die man daraufhin untersucht hat, die Zellen des Cervix-Tumors DNS des entsprechenden, in diesem Falle des Herpes simplex Virus Typ2, enthalten. Wie weit die Persistenz eines onkogenen Virus im Tumorgewebe den gleichen Gesetzen folgt wie die eines latenten, zur Rekurrenz befähigten Virus, zumal es sich hier um das gleiche Agens handelt, müßte dann Gegenstand näherer Untersuchungen sein.

Ein nach wie vor ungelöstes Problem bei der Beweisführung eines kausalen Zusammenhanges zwischen einem Virus und einem menschlichen Tumor besteht darin, daß man nicht sicher zwischen ursächlichem Agens und zufälligem Passagier unterscheiden kann. Übertragungsversuche sind beim Menschen ausgeschlossen. Immunisierungen gegen das Virus mit nachfolgendem Vergleich der Tumorfrequenz bei behandelten und unbehandelten Bevölkerungsgruppen sind ebenfalls nicht vertretbar, solange zur Immunisierung inaktivierte Viruspräparate benutzt werden, die noch virale DNS enthalten (in der Diskussion wird auf diesen Punkt näher eingegangen). Darüberhinaus wären sie nur dann erfolgversprechend, wenn die Tumorentstehung in relativ kurzer Zeit nach der Infektion erfolgen würde, wie man das z.B. vom Burkitt-Lymphom annehmen kann. Im Falle des Cervix-Tumors müßte man wegen des späten Auftretens der Karzinome und wegen der geringen Entstehungswahrscheinlichkeit größere Bevölkerungsgruppen über Jahre oder Jahrzehnte einer medizinischen Datenerfassung unterwerfen.

Es würde gegen die Rolle des Virus als zufälliger Passagier sprechen, wenn seine DNS in einer Vielzahl zu testender Cervix-Tumore ausnahmslos nachgewiesen würde, wenn gezeigt würde, daß die DNS

transkribiert und in virusspezifische Proteine übersetzt wird. In Einzelfällen sind, wie schon beschrieben, alle drei Punkte bestätigt worden: Durch die Reaktivierung des infektiösen Virus aus explantierten Tumorzellen und den Nachweis virusspezifischer Antigene in Tumorzell-Ausstrichen. Entscheidend ist hier die Zahl der zu testenden Biopsien und der ausnahmslose Nachweis. Dann würde zwar das statistische "Immer" eine andere als kausale Beziehung nicht zwingend ausschließen, aber doch äußerst unwahrscheinlich machen. Voraussetzung für die Untersuchungen ist ein empfindlicher Test auf virusspezifische Nukleinsäure, wie er uns in der Nukleinsäurehybridisierung zur Verfügung steht. Seine Brauchbarkeit hat der Test bereits im System Epstein-Barr-Virus und Burkitt-Lymphom unter Beweis gestellt. Mit seiner Hilfe konnte wir die regelmäßige Anwesenheit von EBV-DNS in Biopsien des Burkitt-Lymphoms aufzeigen (123).

So wäre der Nachweis von EBV-DNS im Tumormaterial nicht nur unter dem Aspekt der Viruslatenz interessant, der ausnahmslose Nachweis in einer Vielzahl zu testender Cervix-Tumore würde zugleich eine relevante Aussage über die Ätiologie dieses Tumors sein.

Die DNS von 11 Tumorbiopsien wurde extrahiert, denaturiert und in Mengen von 45 μ g Nitrozellulosemembranen fixiert. 8 dieser DNS-Proben wurden mit radioaktiv markierter DNS zweier HSV-2-Stämme ("US" und "Haase") hybridisiert. Als Kontrollen diente DNS aus Vero- und Mäusezellen, aus Nabelschnurblut, aus den Leukozyten erwachsener Spender und den Zellen permanenter menschlicher Zelllinien sowie DNS aus HSV-infizierten menschlichen Zellen (Tab. 8 und 9).

Herkunft der DNS		Ipm gebunden	% der Eingabe
Vero	Grüne Meerkatze	68	1.3
	Maus	61	1.2
Po.	menschl. Nabelschnurleukozyten	98	1.9
Schw.	"	109	2.1
Rö.	menschl. Leukozyten	94	1.8
Sch.	"	80	1.6
Ro.	Cervix-Karzinom	88	1.7
Go.	"	88	1.7
Sm.	"	84	1.6
Ho.	"	91	1.8
Hep + L-2	HSV-1-infizierte Zellen	529	10.3
HEL + MS	HSV-2-infizierte Zellen	1475	28.6

Tab. 8 : DNS-DNS-Hybridisierung von HSV-2-DNS (Stamm US) mit DNS aus Biopsien des menschlichen Cervix-Karzinoms. 45 µg zellulärer DNS wurden mit 5.2×10^3 Ipm HSV-2-DNS (spezifische Aktivität 4.8×10^5 Ipm/µg) in 1.2 ml 3 x SSC, 0.04 %ig an RSA, 0.1 %ig an SDS, für 22 Std. bei 61.5° hybridisiert.

Herkunft der DNS		Ipm gebunden	% der Eingabe
Mu.-	Cervix-Karzinom	67	1.2
Schö.	"	34	0.62
Ro.	"	30	0.55
Ba.	"	22	0.40
Schä.	"	52	0.95
Fe.	menschl. Nabelschnur-Leukozyten	42	0.76
Schw.	"	19	0.35
HeLa	menschl. Zelllinie	31	0.56
	E. coli	5	0.09
HEL + HSV-1	infizierte menschl. Zellen	429	7.8

Tab. 9 : DNS-DNS-Hybridisierung von HSV-2-DNS (Stamm Haase) mit DNS aus Biopsien des menschlichen Cervix-Karzinoms. 45 µg zellulärer DNS wurden mit 5.5×10^3 Ipm HSV-2DNS (spezifische Radioaktivität 2.7×10^4 Ipm/µg) in 1.0 ml 3 x SSC, 0.04 %ig an RSA, 0.1 %ig an SDS für 22 Std. bei 61.5° hybridisiert.

Herkunft der DNS		Ipm gebunden	% der Eingabe
Go.	Cervix-Karzinom	200	0.95
SM.	"	220	1.05
Ho.	"	217	1.03
Tr.	"	206	0.98
Ro.	"	172	0.82
Ka.	menschl. Nabelschnur-Leukozyten	270	1.29
Wo.	menschl. Leukozyten	272	1.30
Sch.	"	218	1.04
Rö.	"	237	1.13
Vero+HSV-2	infizierte Zellen	1806	8.60

Tab. 10 : DNS-DNS-Hybridisierung von HSV-1-DNS (Stamm) mit DNS aus Biopsien^{Ther} des menschlichen Cervix-Karzinoms. 45 µg zellulärer DNS wurden mit 2.1×10^4 Ipm HSV-1-DNS (spezifische Aktivität 1.1×10^5 Ipm/µg) in 1.0 ml 3 x SSC hybridisiert. Übrige Bedingungen : siehe Legende zu Tab.9.

Herkunft der DNS		Ipm gebunden	% der Eingabe
Schö.	Cervix-Karzinom	384	0.42
Ro.	"	477	0.53
St.	"	629	0.69
Ba.	"	450	0.50
Schw.	menschl. Nabelschnur-Leukozyten	640	0.71
Po.	"	538	0.59
Vo.	"	429	0.48
HEL	primäre menschl. Fibroblasten	312	0.35
KB	menschl. Zelllinie	620	0.69
Vero	Grüne Meerkatze	650	0.72
	E.coli	73	0.08
HEL+HSV-2	infizierte Zellen	21062	23.2

Tab.11 : DNS-RNS-Hybridisierung von HSV-2-spezifischer cRNS mit DNS aus Biopsien von menschlichen Cervix-Karzinomen in 50 %igem Formamid. 45 µg zellulärer DNS wurden mit 9.0×10^5 Ipm cRNS (Stamm Haase) spezifische Aktivität 3.1×10^7 Ipm/µg) in 50 %igem Formamid, 2.5 x SSC, bei 45° für 120 Std. hybridisiert.

Des weiteren wurden fünf DNS-Proben mit markierter HSV-1-DNS hybridisiert. Auch hier diente DNS aus infizierten Zellen als positive, solche aus Leukozyten Neugeborener oder Erwachsener als negative Kontrolle (Tab.10).

In keinem Falle zeigte die DNS aus den Cervix-Karzinomen eine gegenüber den negativen Kontrollen erhöhte Hybridisierungsrate mit viraler DNS.

Vier DNS-Proben aus Tumorbiopsien wurden mit hochmarkierter (spezifische Radioaktivität 3.1×10^7 Ipm/ μ g) cRNS in 50 %igem Formamid zur Reaktion gebracht. Die Hybridisierungsrate der positiven Kontrolle lag bei 23.2 % und 21.062 absoluten Ipm. Die Aktivität der durch Karzinom-DNS gebundenen viralen DNS betrug 384 - 640 Ipm und unterschied sich nicht von der der negativen kontrollen (Tab.11).

In einem Rekonstitutionsexperiment wurde die Empfindlichkeit der Reaktion bestimmt (Abb. 18). Gleichen Mengen (45 μ g) zellulärer DNS wurden steigende Mengen viraler DNS zugemischt. Die Proben wurden denaturiert, auf Zellulosenitrat-Membranen fixiert und mit in vitro transkribierter virusspezifischer cRNS (9.0×10^5 Ipm) in 50 %igem Formamid hybridisiert. Aus dem unteren Bereich der Kurve läßt sich ein Verhältnis von gebundener Radioaktivität zu zugemischter viraler DNS von 132 Ipm/ng ablesen.

Das Gewicht der DNS einer Zelle ist mit 6.0×10^{-12} g, das der DNS eines Herpesvirus-Partikels mit 1.2×10^{-16} g bestimmt worden. Unter der Annahme, daß pro Zelle gerade ein virales Genom persistiert, sollten 45 μ g zellulärer DNS

$$\frac{45 \times 10^{-6} \times 1.2 \times 10^{-16}}{6.0 \times 10^{-12}} \text{ g} = 0.9 \times 10^{-9} \text{ g}$$

viraler DNS enthalten. Aus dem Rekonstitutionsexperiment geht hervor, daß diese Menge viraler DNS $132 \times 0.9 \text{ Ipm} = 119 \text{ Ipm}$ Radioaktivität binden sollte.

Die im Rekonstitutionsexperiment ermittelte Empfindlichkeit der Nachweisreaktion stellt einen unteren Grenzwert dar. Es ist nämlich gezeigt worden, daß die durch RNS abgesättigte DNS bei der Filterhybridisierung von den Membranen eluieren kann (32). Dies würde zu einem Verlust gebundener Radioaktivität im Rekonstitutionsexperiment führen. In der Nachweisreaktion dagegen würden wir dies nicht erwarten, solange wir damit rechnen dürfen, daß die virale DNS in das zelluläre Genom integriert, d.h. kovalent an dieses gebunden vorliegt. Dies ist für die DNS anderer Tumurviren gezeigt worden (16,86,124). Im Falle der onkogenen Herpesviren allerdings ist die Integration der DNS noch nicht geklärt. Nonoyama und Pagano (67) glauben gezeigt zu haben, daß das EBV in einer transformierten Zelle episomal, als eigenständige Einheit, vorliegt. Die Interpretation ihrer Resultate ist jedoch umstritten.

Der Wert von 119 Ipm liegt an der Grenze der durch die Streubreite der Ergebnisse bedingten Empfindlichkeit des Testes, sollte sich aber bei mehreren getesteten Tumoren signifikant über den Hintergrund der negativen Kontrollen erhoben haben. Die Präsenz eines Teils des viralen Genoms pro Zelle kann durch diesen Test nicht ausgeschlossen werden. Deshalb kann auch die kausale Rolle des Virus für den Cervix-Tumor nicht als widerlegt gelten, denn es ist von anderen DNS-Tumurviren gezeigt worden, daß die Funktion eines Teils ihres Genoms für die Zelltransformation ausreichend ist.

Wir können aber schon jetzt die Aussage machen, daß dann die Persistenz des Herpesvirus in den Tumoren sich wesentlich von der in solchem Gewebe unterscheiden muß, in welchem es zu rekurrentem Auftreten befähigt ist. In letzterem müssen komplette Genome vorliegen.

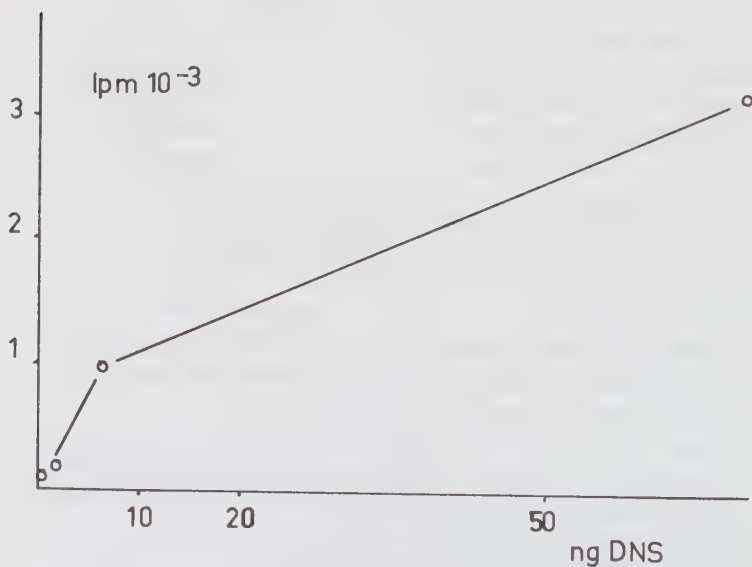


Abb. 18 : Rekonstitutionsexperiment der DNS-cRNS-Hybridisierung. Gleichen Mengen zellulärer DNS wurden steigende Mengen viraler DNS zugemischt und mit 9.0×10^5 lpm cRNS hybridisiert. Die Ordinate zeigt die Menge gebundener Radioaktivität in Abhängigkeit von der Menge der zugemischte viralen DNS.

V. Diskussion.

Zwei hervorstechende biologische Merkmale zahlreicher Herpesviren sind ihre Fähigkeiten, a) in infizierten Wirtsorganismen als latentes Virus zu persistieren und b) bösartige Geschwülste im höheren Organismus zu induzieren. Über die Mechanismen dieser beiden Vorgänge existieren nur sehr vage Vorstellungen, die teils auf ersten Studien an onkogenen Herpesviren, teils auf Analogieschlüssen zu anderen DNS-Tumorviren beruhen. So wissen wir, daß in Herpesvirus-bedingten (oder höchstwahrscheinlich Herpesvirus-bedingten) Tumoren die DNS des entsprechenden Virus vorhanden ist. In einigen Fällen ist gezeigt worden, daß sich diese DNS in den Zellkernen, zum großen Teil mit Chromosomen assoziiert, befindet. Von anderen DNS-Tumorviren wissen wir, daß die virale DNS in die zelluläre DNS integriert ist, d.h. kovalent an diese gebunden vorliegt. Von den Herpesviren ist das bisher noch nicht gezeigt worden, es scheint - zumindest beim Epstein-Barr-Virus - möglicherweise nicht der Fall zu sein. Wir wissen auch nicht, ob die Integration Voraussetzung für die Tumorinduktion ist oder ob sie lediglich die offensichtlich erforderliche genetisch stabile Präsenz des viralen Genoms in den Tumorzellen gewährleistet.

Die Präsenz viraler Nukleinsäure in den Tumorzellen legt den Verdacht nahe, daß die latente Infek-

tion der Herpesviren und die Zelltransformation, als erster Schritt zur Tumorinduktion, im wesentlichen zwei verwandte Erscheinungsformen darstellen: Die latente Infektion mit einem onkogenen Herpesvirus kann zur Zelltransformation führen, welche unter bestimmten, noch nicht näher bekannten Voraussetzungen eine Tumorentstehung bewirken. Diese Vorstellungen, angewandt auf das Herpes-simplex-Virus, stehen im Widerspruch zu unseren Ergebnissen. Denn wir haben gezeigt, daß in den getesteten Tumoren, wenn überhaupt, weniger als ein virales Genom pro Zelle persistiert. Zumindest in diesem Punkt unterscheiden sich Tumorzellen und solche, die ein latentes, zum rekurrenten Auftreten befähigtes Herpesvirus beherbergen: Letztere müssen komplette Virusgenome enthalten.

Roizman und Frenkel (81) haben kürzlich in einem Cervix-Tumor Herpes-simplex-DNS nachweisen können. Sie haben insofern unsere Arbeiten bestätigt, als sie pro Zelle weniger als ein Genom, nämlich nur 40 % der kompletten DNS fanden. Wenn sich dieser Nachweis in zahlreichen zu testenden Cervix-Tumoren regelmäßig führen läßt, dürfen wir darin ein schwerwiegendes Argument für die kausale Rolle des Herpes-simplex-Virus bei der Entstehung des Cervix-Tumors sehen.

Die Präsenz nur eines Teils des viralen Genoms in den Tumorzellen könnte bedeuten, daß inaktivierte oder defekte Viruspartikel für den höheren Organismus unter Umständen gefährlicher sind als das intakte Virus. Durch die Lysierung der Zelle kann es hier nicht zur Realisierung der onkogenen Eigenschaften kommen, während das defekte Virus wegen der ausblei-

benden Zellyse leichter die Zelltransformation bedingen könnte. Hieraus kann sich eine durchaus aktuelle Konsequenz ergeben: Immunisierungen gegen Herpesviren und alle anderen DNS-Tumurviren mittels inaktivierter Viruspräparate sollten im Hinblick auf die eben genannte Möglichkeit einer erneuten kritischen Betrachtung unterzogen werden.

Die Typisierung von Herpes-simplex-Viren mittels einer Hybridisierungsmethode, hat sich als empfindliches und schnelles Verfahren erwiesen, das für die klinische Diagnose von Bedeutung ist. Es übertrifft an Auflösungsvermögen alle serologischen Verfahren bei weitem und dürfte deshalb auch für die Beantwortung epidemiologischer Fragen wichtig sein. Außerdem müßte es möglich sein, auf diese Methode eine differenziertere Typisierung der Herpes-simplex-Viren aufzubauen, die im Hinblick auf beobachtete Subtyp-spezifische Unterschiede bezüglich der Zelltransformation und anderer biologischer Eigenschaften von aktuellem Interesse ist.

Prinzipiell kann dieses Verfahren auch zu Typisierung persistierender, nicht aktivierter Herpesviren dienen. Zur Zeit ist es für diese Aufgabe noch nicht empfindlich genug, doch bieten sich zwei Möglichkeiten einer Verbesserung an: 1. Die spezifische Aktivität der viralen DNS wird erhöht, indem sie durch DNase angedaut und mit Kornberg-Enzym in Gegenwart radioaktiv markierter Triphosphate wieder repariert wird. Dieses Verfahren ist von Nonoyama und Pagano (persönliche Mitteilung) mit Erfolg auf EBV-DNS angewandt worden. 2. Die Hybridisierungsreaktion wird statt mit viraler DNS mit viruspezifischer, hochmarkierter cRNS durchgeführt, deren

Spezifität vorher durch Hybridisierung mit hochgereinigter viraler DNS und nachfolgender Abtrennung erhöht wird.

Die Transformation primärer Zellen durch Herpes-simplex-Viren ist von Duff und Rapp an Hamsterzellen gezeigt worden. Transformationsexperimente mit Nagetierzellen provozieren allerdings das Argument, daß als unmittelbare Ursache für die Transformation latente RNS-Tumorstämme verantwortlich waren. Wir haben deshalb versucht, die Herpesvirus-bedingte Zelltransformation auch an menschlichen Zellen zu zeigen, in denen sich bisher keine RNS-Tumorstämme nachweisen ließen. Diese Experimente verliefen ohne Erfolg. Wir wissen inzwischen aber aus Versuchen von Rapp, daß beträchtliche Unterschiede im onkogenen Verhalten der einzelnen Virusstämme existieren und welche Stämme bezüglich der Zelltransformation besonders aktiv sind. Unsere Experimente müssen deshalb auf solche Stämme ausgedehnt werden. Möglicherweise ist ein bedeutender Erfolg in den Versuchen von Munk zu sehen, dem es kürzlich gelungen ist, primäre menschliche Lungenzellen mit Herpes-simplex-Viren zu transformieren. Zur Zeit jedenfalls ist noch keine eindeutige Aussage über die Auslösung von menschlichen Tumoren durch Herpes-simplex-Viren möglich.

Zusammenfassung der Ergebnisse.

Infektionsversuche mit Herpes-simplex-Viren an zahlreichen Zellen ergaben, daß primäre Zellen nichtmenschlichen Ursprungs (Nierenzellen junger Kaninchen und embryonale Hühnerfibroblasten) besonders gute Virusproduzenten sind. Von den getesteten etablierten Linien erwiesen sich Verozellen als besonders geeignet zur Virusproduktion.

Es wurden Methoden erarbeitet, das Virus vom zellulären Material zu trennen und seine DNS hoch zu reinigen. Durch Transkription dieser DNS mit E.coli-Polymerase wurde markierte, virusspezifische, komplementäre RNS erhalten, die zum Nachweis viraler DNS mittels der Membranhybridisierung sowie der Hybridisierung in situ diente. Die c-RNS hatte ein Molekulargewicht von etwa 2×10^5 , eine spezifische Aktivität von 2.1×10^7 bis 3.1×10^7 Ipm/ μ g, war zu 29 % doppelsträngig und zu über 99 % säurefällbar.

Es wurde ein rasches und sicheres Verfahren erarbeitet, mittels der DNS-DNS-Nukleinsäurehybridisierung Virusisolate als Herpes-simplex-Virus zu identifizieren und nach Serotypen 1 und 2 zu typisieren.

Elf Biopsien von Cervix-Tumoren wurden auf Anwesenheit von Herpes-simplex-Virus-DNS untersucht. Alle Biopsien enthielten, wenn überhaupt, weniger als ein Virus-Genomäquivalent pro Zelle.

Versuche, primäre menschliche Lungenfibroblasten mit UV-inaktiviertem Herpes-simplex-Virus Typ 2 (Stamm Haase) zu transformieren, waren erfolglos.

Die Zellen verhielten sich auch nach der Infektion wie primäre Zellen und gingen nach einer Anzahl von Passagen zugrunde.

Eine gegenüber Herpes-simplex-Virus resistente menschliche Zelllinie wurde nicht gefunden. Die lymphoblastoide Linie 2002 zeigte zunächst resistentes Verhalten, obwohl permanent infektiöses Virus in geringen Mengen produziert wurde. Nach etwa 20 - 25 Passagen starben die infizierten Kulturen ab.

Literaturzusammenstellung.

1. ABODEELY, R.A. und DARLINGTON, R.W., Bact. Proc.
209 (1971)
2. ALONI, Y., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69 2404 (1972)
3. AURELIAN, L. und ROIZMAN, B., Virol. 22 452 (1964)
4. AURELIAN, L. und ROIZMAN, B., J.Mol.biol. 11 539
(1965)
5. AURELIAN, L., STRANDBERG, J.D., MELENDEZ, L.V. und
JOHNSON, L.A., Science, 174 704 (1971)
6. BERNHARD, W., in "Burkitt's Lymphoma" (D.P.BURKITT und
D.H.WRIGHT) Edinburgh 1970, Seite 122
7. BORUN, T.W., SCHARFF, D.M. und ROBBINS, E., Biochim.
Biophys. Acta 149 302 (1967)
8. BRAY, G.A., Anal. Biochem. 1 279 (1960)
9. BURGESS, R.R., J.Biol. Chem. 244 6160 (1969)
10. BURNET, F.M., in "Principles of animal virology", Acad.
Press Inc. New York 1955, Seite 371
11. CHAMBERLIN, M. und BERG, P., Proc. Natl. Acad. Sci.
(USA), 48 81 (1962)
12. CHANG, R.S., HSIEH, M.W. und BLANKENSHIP, W.,
J.Natl.Cancer Inst. 47 479 (1971)
13. DAVIS, B.D., DULBECCO, R., EISEN, H.N., GINSBERG, H.S.
und WOOD, W.B.Jr., Microbiology,
New York 1970, Seite 1243
14. DIAMOND, L., Intern. J. Cancer 2 143 (1967)
15. DIEHL, V., HENLE, G., HENLE, W. und KOHN, G., J.Virol.
2 663 (1968)
16. BURLINGHAM, B.T. und DORFLER, W., J.Virol. 7 707 (1971)
17. DOURMASHKIN, R., J.Natl.Cancer Inst. 36 877 (1966)
18. DUFF, R. und RAPP, F., Nature N.Biol. 233 48 (1971)
19. DUFF, R. und RAPP, F., J. Virol. 8 469 (1971)
20. EAGLE, H., Science 130 432 (1959)
21. ELLISON, S.H., CARTON, C.A. und ROSE, H.M., J.Inf.
Dis. 105 161 (1959)
22. EPSTEIN, M.A., ACHONG, B.G. und BARR, Y.M.,
Lancet II, 702 (1964)
23. EPSTEIN, M.A. und HERDSON, P.B., Brit. J. Cancer,
17 56 (1963)

24. FELDMAN, L.A., SHEPPARD, A.D. und BORNSTEIN, M.B.
J.Virol. 2 621 (1968)
25. FIGUERO, M.E. und RAWLS, W.E., J.Gen.Virol. 4 259 (1969)
26. GERBER, P., Proc.Natl.Acad.Sci.(USA) 69 83 (1972)
27. GEY, G.O., COFFMAN, W.D. und KUBICEK, M.T.
Cancer Res. 12 264 (1952)
28. GILLESPIE, D. und SPIEGELMAN, S., J.Mol.Biol. 12 829
(1965)
29. GOOD, R.A., CAMPBELL, B., Proc.Soc.Exptl.Biol.Med.
68 82 (1948)
30. GRÜTER, W., Münch.Med.Wschr. 71 1058 (1924)
31. GUDNADOTTIR, M., HELGADOTTIR, H. und BJARNASSON, O.,
Exp.neurol. 9 85 (1964)
32. HAAS, M., VOGT, M., WEINBERG, R. und DULBECCO, R.,
persönl. Mitteilung
33. HAMPAR, B., DERGE, J.G., MARTOS, L.M. und WALKER, J.L.
Proc.Natl.Acad.Sci.(USA) 69 78 (1972)
34. HANKS, J.H. und WALLACE, R.E., Proc.Soc.Exptl.Biol.Med.
71 196 (1949)
35. HANSHAW, J.B., Postgrad.Med. 35 472 (1964)
36. HEINE, U., KONDRATICK, J., ABLASHI, V.D., ARMSTRONG, G.R.
und DALTON, A.J., Cancer Res. 31 542 (1971)
37. HENLE, G. und HENLE, W., J.Bacteriol. 91 1248 (1966)
38. HENLE, W., HENLE, G. und zur Hausen, H., Cancer Res.
29 489 (1969)
39. HINZE, H.C., Intern.J.Cancer 8 514 (1971)
40. HINZE, H.C. und WALKER, D.L., J.Bacteriol. 82 498 (1961)
41. IWAKATA, S. und GRACE, J.T.Jr., N.Y.J.Med. 64 2279 (1964)
42. JAWETZ, E., MELNICK, J.L. und ADELBERG, E.A. in Medizi-
nische Mikrobiol. Springer Verlag, Berlin,
Göttingen, Heidelber, 1963, Seite 534
43. JAWETZ, E., MELNICK, J.L. und ADELBERG, E.A., op. cit.
Seite 484
44. JONES, K.W., Nature 225 912 (1970)
45. KIBRICK, S. und GOODING, G., in "Slow, latent and
temperate virus infections, Natl.Inst.Neur.
Dis. Monogr. Nr. 2 143 (1965)
46. KIEFF, D.E., BACHENHEIMER, S.L. und ROIZMAN, B.,
J.Virol. 8 125 (1971)
47. KIEFF, D.E., HOYER, B., BACHENHEIMER, S.L. und ROIZMAN, B.,
J.Virol. 9 738 (1972)

48. LAUFS, R. und FLECKENSTEIN, B., vth Intern. Symp. Comp. Leuk. Res., Padua 1971 im Druck
49. LEIGHTON, S.B. und RUBENSTEIN, I., J. Mol. Biol. 46 313 (1969)
50. LUDWIG, H., Med. Microbiol. Immunol, 157 186 (1972)
51. MCCARTHY, B. und CHURCH, R.B., Ann. Rev. Biochem. 39 701 (1970)
52. MELENDEZ, L.V., HUNT, R.D., DANIEL, M.D., GARCIA, F.G. und FRASER, C.E.O., Lab. Anim. Care 19 378 1969
53. MELENDEZ, L.V., HUNT, R.D., KING, N.W., BARAHONA, H.H., DANIEL, M.D., FRASER, C.E.O. und GARCIA, F.G. Nature N. Biol. 235 182 (1972)
54. MELNICK, J.L., MIDULLA, M., WIMBERLY, I., BARRERA-ORO, J.G. und LEVY, B.M. J. Immunol. 92 376 (1964)
55. MOORE, G.E., GERNER, R. und FRANKLIN, H.A., J. Amer. Med. Ass. 199 519 (1967)
56. MOORE, G.E., GRACE, J.T. Jr., CITRON, P., GERNER, R. und BARNS, A., N.Y. State J. Med. 66 2757 (1966)
57. MUNK, K., Amer. Canc. Soc. Conf. on herpes virus and cerv. carcinoma, Key Biscayne, 8. - 10. Dez. 1972
58. MUNYON, W., KRAISELBURD, E., DAVIS, D. und MANN, J., J. Virol. 7 813 (1971)
59. NADKARNI, J.S., NADKARNI, J.J., KLEIN, G., HENLE, W., HENLE, G. und CLIFFORD, P., Intern. J. Cancer, 6 10 (1970)
60. NAHMIAS, A.J. und DOWDLE, W.R., Prog. Med. Virol. Vol. 10 110 (1968)
61. NAHMIAS, A.J., NAIB, Z.M. und JOSEY, W.E. Perspect. Virol. 7 73 (1971)
62. NAHMIAS, A.J., NAIB, Z.M., JOSEY, W.E. und MURPHY, F., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 134 1065 (1970)
63. NAHMIAS, A.J., JOSEY, W.E., NAIB, Z.M., LUCE, C. und GUEST, B., Amer. J. Epidemiol. 91 547 (1970)
64. NAIB, Z.M., NAHMIAS, A.J. und JOSEY, W.E. Cancer 19 1026 (1966)
65. NAIB, Z.M., NAHMIAS, A.J., JOSEY, W.E. und KRAMER, J.H. Cancer 23 940 (1969)
66. NILSON, K., KLEIN, G., HENLE, W. und HENLE, G., Intern. J. Cancer 8 443 (1971)
67. NONOYAMA, ^M und PAGANO, J.S., Nature N.B. 238 169 (1972)

68. O'NEILL, F.J., GOLDBERG, R.J. und RAPP, F.,
J.Gen.Virol. 14 189 (1972)
69. PARDUE, M.L. und GALL, J.G.,
Proc.Natl.Acad.Sci.(USA) 64 600 (1969)
70. PAINE, T.F., Bacteriol.Rev. 28 472 (1964)
71. PAYNE, L.N. und BIGGS, P.M.,
J.Natl.Cancer Inst. 39 281 (1967)
72. PLUMMER, G., COLEMAN, P.L. und HENSON, D.,
Inf.Immun. 5 172 (1972)
73. RABSON, A.S., O'CONNOR, G.T., BARON, S., WHANG, J.J.
und LEGALLAIS, F.Y., Intern.J.Cancer
1 89 (1966)
74. RAPP, F., CONNOR, R., GLASER, R. und DUFF, R.,
F.Virol. 9 1059 (1972)
75. RAPP, F. und HSU, T.C., Virol. 25 401 (1965)
76. RAWLS, W.E., TOMPKINS, W.A.F. und MELNICK, J.L.,
Amer.J.Epidemiol. 89 547 (1969)
77. ROIZMAN, B., in "Perspect. in Virol. IV" (M.POLLARD)
New York 1965, Seite 283
78. ROIZMAN, B. Current Topics Microbiol. 49 25 (1969)
79. ROIZMAN, B., in "Oncogenesis and Herpesviruses"
(BIGGS, P.M., DE-THE, G., PAYNE, L.N.)
IRAC, 1972, Seite 1
80. ROIZMAN, B., BORMAN, G.S. und KAMALI-ROUSTA, M.,
Nature 206 1374 (1965)
81. ROIZMAN, B. und FRENKEL, N., Amer.Canc.Soc.Conf.on
Herpes Virus and Cerv.Carcinoma,
Key Biscayne, 8. - 12. Dez. 1972
82. ROIZMAN, B. und SPEAR, P.S., J.Virol. 2 83 (1968)
83. ROIZMAN, B. und TURNER, T.B., Probl.in Virol. 5
593 (1960)
84. ROUS, und JONES, J. Exptl.Med. 23 549 (1916)
85. ROYSTON, I. und AURELIAN, L.,
Proc.Natl.Acad.Sci.(USA) 67 204 (1970)
86. SAMBROOK, J., WESTPHAL, H., SHRINAVASAN, P.R. und
DULBECCO, R., Proc.Natl.Acad.Sci(USA)
60 1288 (1968)
87. SCHILDKRAUT, C.L., MARFIS, J. und DOTY, P.,
J.Mol.Biol. 3 595 (1961)
88. SCHMIDT, N.J. und LENETTE, E.H., J.Immunol. 86 137
(1961)
89. SCHNEWEIS, K.E., Z.Immunforsch. 124 24 (1962)

90. SCHNEWEIS, K.E., Zbl.Bakt.Parasitenkde.
(I.Abt.Orig.) 186 467 (1962)
91. SCHULTE-HOLTHAUSEN, H. 6th Meeting Soc. Gen.
Microbiol. London, 4.-6.Jan. 1971
92. SCHULTE-HOLTHAUSEN, H. 8.Viruskoll. d.Deutschen
Forschungsgem. Marburg, 23.-24.Sept.1971
93. SCHULTE-HOLTHAUSEN, H., 13.Tag. d. Österreich. Ges. f.
Hyg., Microbiol. und Parasitenk.
Salzbg. 2.-4.Mai 1972
94. SCHULTE-HOLTHAUSEN, H., 1972, zum Druck eingereicht
95. SCHULTE-HOLTHAUSEN, H., Münch.Med.Wschr., im Druck
96. SCHULTE-HOLTHAUSEN, H. und ZUR HAUSEN, H.,
Virol. 40 776 (1970)
97. SCHULZE, J.T. und SCHLESINGER, W., Virol. 19 40 (1963)
98. SCOTT, T.F.McN., in "Viral and Rickettsial Infections
of man (RIVERS und HORSFALL)
Philadelphia, 1959, Seite 757
99. SCOTT, T.F.McN. und TOKUMARU, T., in "Viral and
Rickettsial Infections of Man" Philad.
1965, Seite 892
100. SHUBIAZE, A.K. und KHUAN, C.S. Probl.Virol. 4 78 (1959)
101. SOLOMON, J.J., WITTER, R.L., NAZERIAN, K. und
BURMESTER, B.R.,
Proc.Soc.Exptl.Biol. 127 173 (1968)
102. STEVENS, J.G. und COOK, M.L., Science 173 843 (1971)
103. STEVENS, J.G., NESBURN, A.B. COOK, M.L.,
Nature N. Biol. 235 216 (1972)
104. STRANDLER, H. und CANTELL, K., Ann.Med.Exptl.Fenn.
44 265 (1966)
105. SZANTO, J., Acta Virol. 7 385 (1963)
106. SZBALSKI, W., Methods in Encymol. Vol.12, part B,
Acad.Press, N.Y.1968, Seite 330
107. TYTELL, A.A. und NEUMAN, R.E., Proc.Soc.Exptl.Biol.
Med. 113 343 (1963)
108. VAN HOOSIER, G.L.Jr. und MELNICK, J.L.
Texas Repts.Biol.Med. 19 376 (1961)
109. WAGNER, K.E. und ROIZMAN, B., J.Virol. 4 36 (1969)
110. WARNER, J.R., KNOPE, P. und RICH, A.,
Proc.Natl.Acad.Sci.(USA) 49 122 (1963)
111. WARNER, J.R., SOEIRO, R. BIRNBOIM, H.C., GIRARD, M.
und Darnell, J.E.J. Mol.Biol. 19 349 (1966)

112. WARREN, S.L., CARPENTER, C.M und BOAK, R.A.
J.Exptl.Med. 71 155 (1940)
113. WEINBERG, A. und BECKER, Y., Virol. 39 312 (1969)
114. WELLER, T.H. und WITTON, H.M., J.Exptl.Med. 108
869 (1958)
115. WILDY, P., Monogr. in Virol. Vol. 5 , Basel 1971
116. YASUMURA, T. und KAWAKITA, Nippon Rinsho 21 1201
(1963)
117. ZUR HAUSEN, H., J.Virol. 2 218 (1968)
118. ZUR HAUSEN, H., J.Natl.Cancer Inst. 38 683 (1967)
119. ZUR HAUSEN, H., DIEHL, V., WOLF, H., SCHULTE-HOLT-
HAUSEN, H. und SCHNEIDER, U. Nature 237
189 (1972)
120. ZUR HAUSEN, H., HENLE, W., HUMMELER, K., DIEHL, V. und
HENLE, G., J.Virol. 1 830 (1967)
121. ZUR HAUSEN, H. und SCHULTE-HOLTHAUSEN, H.
Nature, 227 245 (1970)
122. ZUR HAUSEN, H. und SCHULTE-HOLTHAUSEN, H., in
"Oncogenesis and Herpesviruses, BIGGS, P.M.,
DE THE, G. and PAYNE, L.N. IRAC 321 (1972)
123. ZUR HAUSEN, H. und SCHULTE-HOLTHAUSEN, H., KLEIN, G.,
HENLE, W., HENLE, G., CLIFFORD, P. und
SANTESSON, L., Nature, 228 1056 (1970)
124. ZUR HAUSEN, H. und SOKOL, F., J.Virol. 4 256 (1969)

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hegl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990